

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2002-500201  
(P2002-500201A)

(43) 公表日 平成14年1月8日 (2002.1.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト* (参考)
A 6 1 K 47/32		A 6 1 K 47/32	4 C 0 7 6
9/00		9/00	4 C 0 8 6
31/7105		31/7105	
31/711		31/711	
47/42		47/42	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 62 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-527278(P2000-527278)  
(86) (22) 出願日 平成11年1月5日 (1999.1.5)  
(85) 翻訳文提出日 平成12年7月5日 (2000.7.5)  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 0 0 1 2 2  
(87) 国際公開番号 W O 9 9 / 3 4 8 3 1  
(87) 国際公開日 平成11年7月15日 (1999.7.15)  
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 7 0 , 4 1 1  
(32) 優先日 平成10年1月5日 (1998.1.5)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)  
(81) 指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,  
D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I  
T , L U , M C , N L , P T , S E ) , A U , C A , J  
P

(71) 出願人 ユニバーシティ オブ ワシントン  
アメリカ合衆国 ワシントン州 シアト  
ル、ユニバーシティ、ウェイ、ノース、イ  
ースト、4014  
(71) 出願人 ユニバーシティ オブ マサチューセツ  
アメリカ合衆国 マサチューセツ  
02108, ボストン, トレモント スト  
リート 18, スイート 800  
(72) 発明者 ホフマン, アラン エス.  
アメリカ合衆国 ワシントン 98105,  
シアトル, エヌ.イー., ウェスト  
ローレル ドライブ 4528  
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膜破壊剤を使用する増強された輸送

(57) 【要約】

治療剤および診断剤、または代謝産物、または他の分析物の、細胞からの、細胞内区画からの、あるいは細胞層または細胞障壁を通過しての、輸送あるいは放出のための組成物および方法が記載される。これらの組成物は、膜障壁輸送増強剤を含み、そして通常、増強因子および/あるいは、破壊または透過性の変化、輸送の変化、もしくは放出の変化をもたらす刺激への曝露と組合せて投与される。好ましい実施態様において、これらの組成物は、エンドソームの低pHに応答してエンドソーム膜を破壊するが、細胞膜に対しては比較的不活性である化合物を含み、治療剤または診断剤と、直接あるいは間接的に結合される。pH以外の刺激および/または増強因子 (例えば、光、電気的刺激、電磁気的刺激、超音波、温度またはそれらの組合せ) に応答性である他の破壊剤もまた使用され得る。これらの化合物は、イオン結合、共有結合、または水素結合により、送達される薬剤あるいは送達される薬剤と複合体を形成するリガンドに結合され得る。送達される薬剤は、治療剤および/または診断剤であり得る。超音波、イオン泳動、および/または電

気泳動のような、送達を増強する処置もまた、破壊剤と共に使用され得る。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 細胞膜、細胞の間、細胞障壁、または脂質膜を通過しての、輸送あるいは放出を増強する組成物であって、以下：

少なくとも1つの刺激に応答して構造または特性を変化するポリマー、疎水性でありかつpH変化の機能として細胞膜に細孔を形成するペプチド、およびリン脂質破壊剤からなる群から選択される、膜障壁輸送増強剤、ならびに

該薬剤が該膜を破壊する有効性を誘導または増強する手段を含む、組成物。

【請求項2】 前記薬剤を誘導する手段が、ポリマー構造の変化を誘導する刺激である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 前記膜障壁輸送増強剤を誘導する手段が、pH、光、イオン強度、溶媒組成物、温度、および電場からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】 前記膜障壁輸送増強剤の有効性を増強する手段が、超音波、電場、放射線、またはその組合せからなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】 細胞、細胞膜、または細胞障壁への輸送、あるいは細胞、細胞膜、または細胞障壁を通過しての輸送のための、請求項1に記載の組成物であって、診断剤または治療剤と組合せた前記膜障壁輸送増強剤を含む、組成物。

【請求項6】 前記膜障壁輸送増強剤が、pH感受性であり、そして生理学的pHで構造または特性を変化しないが、約5.0と6.5との間のpH範囲で構造または特性を変化する、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】 請求項6に記載の組成物であって、ここで、前記pH感受性ポリマーが、アクリル酸、 $C_{1-6}$ 直鎖2- $\alpha$ -アルキルアクリル酸、 $C_{1-6}$ 分枝型2- $\alpha$ -アルキルアクリル酸、および $C_{1-6}$ 環状2- $\alpha$ -アルキルアクリル酸、アクリル酸でコポリマー化されたアクリル酸のエステル、イミダゾール基を含むタンパク質またはペプチドを含む1つ以上のポリマーブロックを含むポリマー、からなる群から選択されるモノマーから調製されたモノマー単位を含む、グラフトコポリマー、ブロックコポリマー、ランダムコポリマーまたは混合物である、

組成物。

【請求項8】 膜障壁輸送増強剤が、細胞表面に結合するリガンドと結合される、請求項1に記載の組成物。

【請求項9】 リソソーム分解を減少する化合物をさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項10】 前記治療剤が細胞傷害性化合物である、請求項5に記載の組成物。

【請求項11】 ポリカチオンポリマーをさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項12】 前記治療剤が、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸、または核酸分子である、請求項5に記載の組成物。

【請求項13】 微粒子、ナノ粒子、リポソーム、エマルジョンおよび脂質小胞からなる群から選択されるキャリアをさらに含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項14】 前記膜を破壊する前記薬剤の有効性を増強する前記手段が、超音波である、請求項1に記載の組成物。

【請求項15】 細胞膜、細胞の間、細胞障壁、または脂質膜を通過して、輸送あるいは放出を増強するための方法であって、前記細胞、細胞膜、細胞層、細胞障壁、または脂質膜に、請求項1～14に記載の組成物のいずれかを投与する工程を包含する、方法。

【請求項16】 前記膜を破壊する前記薬剤の有効性を増強する前記手段が、20kHzと10MHzとの間で与えられる超音波である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 前記組成物が懸濁液として細胞に投与される、請求項15に記載の方法。

【請求項18】 前記組成物が細胞の層に投与されて、該細胞層を通過しての輸送を増強する、請求項15に記載の方法。

【請求項19】 前記組成物が脂質膜に投与されて、該脂質膜への分子の輸送、または該脂質膜からの分子の輸送を増強する、請求項15に記載の方法。

【請求項20】 前記組成物が、電気泳動またはイオン泳動と組合せて投与される、請求項15に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本発明は、治療剤の送達分野にあり、そして特に、膜障壁輸送増強剤を単独で、または刺激および／もしくは増強因子（この薬剤の構造および／または特性を改変する）と組合せて使用する、細胞のサイトゾルへの、細胞障壁または細胞の層を通しての、または脂質膜を通しての、分子の輸送または送達の増強分野にある。

## 【0002】

本出願は、Allan S. Hoffman、Patrick Stayton、およびOliver Pressにより1998年1月5日出願された、「膜破壊剤」という題の米国特許第60/070,411号に対する優先権を主張する。

## 【0003】

（連邦政府により資金援助された研究に関する陳述）

米国政府は、国立衛生研究所助成金、国立総合医学研究所助成金GM 53771-02に基づき、本発明において特定の権利を有する。

## 【0004】

（発明の背景）

治療化合物および診断化合物の、細胞への特異的で有効な送達は、ほとんどの製薬会社の主要な目標である。多数の異なるアプローチが、特異性および取り込みを増加するために利用されてきた。最も一般的なアプローチは、特異的な型の細胞に対する治療剤または診断剤を標的化してきた。それは、それら薬剤を、細胞に特異的にかまたは優勢的に結合する抗原を認識する抗体に対して結合体化することによる。他の薬剤（例えば、ポリカチオン複合体、リポソーム、および脂質複合体）は、一般に細胞による化合物の取り込みを増加するために使用されてきた。

## 【0005】

細胞内に送達される場合にのみ有効ないくつかの治療剤が存在し、遺伝物質および種々のタンパク質を含む。遺伝子治療は、遺伝的障害の処置のため、種々の

細胞（例えば、腫瘍細胞）中の遺伝物質の変異を引き起こすために、そして細胞の種々の部位に結合または相互作用して効果をもたらすために、遺伝物質の細胞内送達を必要とする。タンパク質の例には、エンドソームから細胞質に放出された場合にのみ毒性である毒素を含む。それらの特異性を増加するために、腫瘍に結合した抗原を標的化する抗体と結合された毒素を含む免疫毒素が、調製されてきた。しかし、免疫毒素は、治療剤として制限された成功を有してきた。それは、腫瘍小結節への不十分な浸透およびサイトゾルのリボソームへの毒素の有効でない送達に部分的に起因する。

#### 【0006】

化合物（例えば、タンパク質、遺伝物質、および他の薬物および診断化合物）を細胞内に送達することは、しばしば困難である。なぜなら、細胞膜が、これらの化合物の通過を妨害するからである。種々の方法が、薬剤を細胞内に投与するために開発されてきた。例えば、遺伝物質が、ウイルスベクター、DNA/脂質複合体およびリポソームを使用して、インビボ、インビトロ、およびエキソビボで細胞に投与されてきた。DNAはまた、合成カチオンポリマーおよび合成カチオンコポリマーならびに天然のカチオンキャリア（例えば、キトサン）によって、送達されてきた。時々、これらの合成ポリマーは、疎水性に改変されてエンドサイトーシスを増強する。ウイルスベクターは有効であるが、一方、生きているベクターの安全性および反復投与後の免疫応答の発生に関する疑問が残る。脂質複合体およびリポソームは、DNAを細胞の核にトランスフェクトするのにあまり有効でないようであり、そしてマクロファージによりインビボで潜在的に破壊され得る。

#### 【0007】

レセプター媒介性エンドサイトーシスは、特異的な細胞型を標的化するための、そして治療剤を細胞内に送達するための代替手段を提供する。レセプター媒介性エンドサイトーシス（RME）は、リガンドが、真核生物の細胞膜上の細胞表面レセプターに結合する場合に生じ、非平衡現象のカスケードを開始するか、または伴い、クラスリンで覆われた小胞内の膜複合体の細胞の陥入に到る。特異的細胞表面レセプターと相互作用する化合物が、特異的細胞表面レセプターを標的

化するために使用される。それらの化合物は、一旦、化合物が細胞表面レセプターと相互作用すると、エンドソームに形質膜陥入される。結合は、化合物と直接なされるか、または、DNAの場合は、ポリカチオンポリマー（例えば、次いで、DNAと複合体化するポリリジンおよびDEAE-デキストランとの結合を通じてなされてきた。Haenslerら、Bioconj. Chem.、4:372~379（1993）。

#### 【0008】

治療剤が細胞内に送達された後でさえ、細胞での正常な輸送が、それら薬剤の有効性を最小にし得る。例えば、特定の抗体-抗原結合物が、容易に形質膜陥入される。しかし、エンドサイトーシスの後、その抗体は、サイトゾルに放出されず、むしろ分解のためにリソソームに輸送されるまでエンドソームに分離されたままである。Press, O. W. ら、Cancer Research、48:2249~2257（1988）。エンドソームは、膜結合リン脂質小胞であり、細胞内輸送およびインターナライズされたタンパク質の分解において機能する。エンドソームの内部pHは、5.0と5.5との間である。この抗体と結合された毒素は、エンドソームに同様に単離され、そして、リソソームに輸送された場合、有効でなくされる。遺伝物質は、負に荷電されているので、しばしばポリカチオン物質（例えば、キトサンおよびポリリシン）と、細胞への送達のために複合体化される。ポリカチオン/核酸複合体を使用する、免疫治療および遺伝子治療は両方とも、細胞によるエンドソームからリソソームへの複合体の輸送により制限され、リソソームで、抗体結合物または核酸が分解され、そして有効でなくされる。

#### 【0009】

従って、多くの潜在的に有用な治療の主な制限は、薬剤が、所望の細胞に標的化され得、そして細胞により形質膜陥入され得る場合でさえ、しばしばエンドソームからサイトゾルに有効に放出されず、リソソームにより分解されることである。

#### 【0010】

これらの薬剤のリソソーム分解を避けるか、または最小にするためのいくつか

の方法が、提案されてきた。1つの方法は、リソソーム栄養性物質（例えば、クロロキン）を、治療剤を細胞内に投与するために使用される処方で封入する工程を含む。別の方法は、エンドソームを破壊して、その結果、その薬剤が、リソソームに輸送され、リソソームに分解される前にサイトゾルに送達されるようにする工程を含む。エンドソームを破壊して、物質がリソソームに決して接触しないようにすることが好ましい。少なくとも2つの経路が、エンドソーム膜を破壊するために開発されてきた。1つの方法は、エンドソームの内側のpHを利用し、そして生理学的pH（約7.4）で比較的親水性であり、かつエンドソームの内側のpHで比較的疎水性である物質を使用する。このような物質の例は、ポリマー（例えば、疎水性ポリ酸であるポリ（2-エチルアクリル酸）（PEAA））を含むカルボン酸である。これらは、アルカリ性pHで負に荷電し、そしてエンドソームの内側のpHで無電荷であり、これはカルボン酸部分のプロトン化に起因する。

#### 【0011】

PEAAは、pH依存性の様式で脂質膜を可溶化すること、すなわち、酸性pH（約6.3）で膜を透過および可溶化させる一方、アルカリ性pHでは効果を有さないことが示されてきた。Thomas, J. L. ら、Biophysical Journal 67:1101~1106 (1994); Thomas, J. L. ら、Acc. Chem. Res., 25:336~342 (1992)。PEAAの効果は、構造よりもむしろその両親媒性に起因し、このことは、疎水的に駆動されるミセル化プロセスに一致する、ということが仮定されてきた。同様のプロセスは、アポリポタンパク質、メリチン、および他の両親媒性 $\alpha$ ヘリックススペースのポリペプチドと、脂質膜との相互作用について仮定されてきた。

#### 【0012】

種々のペプチドはまた、pH依存性の様式で、エンドソーム膜を破壊する。リポソーム、赤血球、およびエンドソームを破壊することが示されるペプチドの例は、ウイルスペプチド（例えば、インフルエンザウイルスペプチド）およびインフルエンザウイルス赤血球凝集素の23のアミノ末端アミノ酸配列を含むペプチ



ド、および、ウイルスがpH依存性の様式でエンドソーム膜を不安定にする関連ペプチド（例えば、反復するグルタミン酸－アラニン－ロイシン－アラニンブロックを含むGALA（EALAとしても公知））を含む。これらのペプチドは、培養された細胞への取り込みのためのレセプター媒介性エンドサイトーシス経路を利用したDNA複合体と結合されてきた。pH特異的赤血球破壊と遺伝子転移との間の強い関連性が、認められた。Plank, C. ら、J. Biol. Chem. 17 (269) : 12918~12924 (1994) ; Hughes, J. A. ら、Pharm Res. 13 (3) : 404~ (1996)。他のペプチドは、膜チャネル形成物質である、メリチンおよび誘導体を含む。Pawlak, M. ら、Protein Science 3 : 1788~1805 (1994)。GALAは、ポリカチオンポリマー（アクリル酸メチルおよびエチレンジアミンから合成された樹状ポリマーである、ポリアミドアミンカスケードポリマー）と結合化されてきており、そして、そのポリカチオンポリマーのブロックが、レセプター遺伝子をコードするプラスミドと複合化されてきた。Haensler, J. ら、Bioconj. Chem. , 4 : 372~379 (1993)。

#### 【0013】

これらの方法または物質は全て、輸送の問題または送達の問題を解決しなかった。従って、診断剤および／または治療剤を、細胞の細胞質に、有意なりポソーム分解を伴わずに送達するための、改良された組成物を提供することは、有利である。

#### 【0014】

診断剤または治療剤の増強された輸送のための組成物を提供することが、本発明の別の目的であり、その組成物は、タンパク質および遺伝物質、あるいは他の細胞膜、細胞障壁または細胞層を通る他の分子、または脂質膜を通る他の分子を含む。

#### 【0015】

例えば、送達または輸送を増強するための非侵入性的手段（例えば、超音波）を使用して外部から制御および操作され得る、このような組成物を提供すること

が、本発明のさらなる目的である。

#### 【0016】

##### (発明の要旨)

治療剤および診断剤、または代謝産物、または他の分析物の、細胞からの、細胞内区画からの、細胞層または細胞障壁または脂質膜を通過しての輸送あるいは放出のための組成物および方法が記載される。この組成物は、膜破壊剤または「膜障壁輸送増強剤」を含み、そして通常、増強因子および／あるいは、破壊、輸送、または放出をもたらす刺激への曝露と組合せて投与される。好ましい実施態様において、これらの組成物は、エンドソームの低pHに応答してエンドソーム膜を破壊するが、細胞膜に対しては比較的不活性である化合物を含み、治療剤または診断剤と、直接あるいは間接的に複合体化される。他の破壊的刺激（例えば、光、電氣的刺激、電磁氣的刺激、超音波、温度またはそれらの組合せ）が、膜障壁輸送増強剤と共に使用され得る。これらの化合物は、イオン結合、共有結合、疎水結合または水素結合により、送達される薬剤、送達される薬剤と複合体を形成するリガンド、あるいはキャリアに結合され得る。送達される薬剤は、治療剤および／または診断剤であり得、タンパク質またはペプチド、合成有機分子、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、糖質、金属、放射性標識物、あるいはそれらの組合せを含む。

#### 【0017】

好ましい実施態様において、エンドソーム膜破壊化合物はポリマーであり、最も好ましくは、生理学的pH（約7.4）では不活性だが、エンドソームの内側のpH範囲（約5.1と5.5との間）ではエンドソーム膜を破壊する、pH感受性ポリマーである。適切なポリマーには、ポリ（アルキル）アクリル酸、カチオンポリマー、エンドソームの内側のpH範囲でエンドソームを破壊し得るpH感受性タンパク質および／またはペプチドとこれらポリマーとのコポリマー、ならびにエンドソーム膜を破壊することが公知である、イミダゾール基および／または他の基を含むペプチドとのコポリマーが、挙げられる。必要に応じて、これらの組成物は、リソソームの機能を最小にするか、エンドサイトーシスを増強するか、または特定の細胞型に対してこれらの組成物を標的化する化合物を含み得る。

る。あるいは、または、さらに、これらの組成物は、送達される薬剤と複合体を形成するリガンド（例えば、ポリリシンまたはキトサンのようなポリカチオン物質）を含み得、このリガンドは、薬剤を安定化し、そしていくつかの場合には、膜破壊を引き起こすことによってエンドサイトーシスをさらに増強する。これらの組成物はまた、キャリア（例えば、ナノ粒子または微粒子、リポソームまたは脂質小胞）を含み得る。脂質小胞、特にカチオンリポソームは、それ自体が、膜破壊を引き起こし得る。膜破壊剤は、これらのキャリア上にか、中にか、または内部に組み込まれ得る。これらの組成物は、公知の方法論を使用して、その必要がある患者を診断または処置するのに有効な量で、全身にかまたは局所的に投与され得る。これらの物質は、例えば、遺伝子治療のための、細胞へのインビトロでの遺伝物質の送達に特に有用である。これらの組成物はまた、膜破壊を引き起こす外部の刺激（pHの変化を含む）に容易に曝露され得る他の型の細胞（例えば、細菌細胞）の操作にも有用である。

#### 【0018】

送達を増強する処置はまた、膜破壊剤を伴って使用され得る。特に好ましい実施態様において、超音波が、細胞へのもしくは細胞外への、または皮膚を通過しての、送達あるいは輸送を増強するために使用される。これは、薬物送達のためだけでなく、グルコースのような分析物の輸送にも有用である。次いでこれは測定され得、そして間質液に存在する量は血液レベルに関連する。この処置はまた、他の細胞型（例えば、内皮細胞および平滑筋細胞）への、特に動脈環境において、例えば、再狭窄を処置または予防するための遺伝子治療に特に有用である。この処置は、膜破壊剤投与の前に、同時に、または以後に、その部位に適用され得る。超音波の1つの利点は、膜破壊剤（好ましくは、特定の細胞に標的化されている）が、全身に投与されて、薬剤が末端の位置に移動する時間を与え、続いて超音波を投与し得ることである。好ましい型の超音波は、高強度集中超音波（HIFU）である。この超音波は、種々の手段により送達され得る。この手段には、処置される組織の表面への、または、平面波と集中音波の両方が利用され得る、組織表面から離れたいくらかの距離での変換器の直接適用を含む。最適な振動数は、代表的には、20kHz～10MHz、好ましくは、3MHzよりも少な

い範囲である。

### 【0019】

(発明の詳細な説明)

(A. 膜輸送の増強のための組成物およびそれらの作製の方法)

(I. 膜障壁輸送増強剤)

任意の膜破壊剤は、細胞膜、リポソームもしくは他の脂質小胞、細胞内の膜を通じる、または角質層のような細胞の層を通じる輸送を変えるために用いられ得る。この膜破壊剤は、送達後、治療剤もしくは診断剤が機能する能力に有害な影響をせず、そして膜または間質の空隙を破壊し、結果として送達されるべき薬物は細胞または細胞層を通過する。本明細書において「膜破壊剤」といわれるが、この薬剤は実際には膜を破壊し得ない、したがってこの用語は、「膜障壁輸送増強剤」と互換的に用いられる。例えば、多数のポリマーが、環境条件における大きい物理的变化から小さい物理的变化（例えば溶液pH、イオン強度、溶媒組成、温度、光および電場）に反応する。これらのポリマーは、刺激応答的ポリマー、環境感受性ポリマー、「インテリジェントな」ポリマーまたは「利口な」ポリマーといわれる。Hoffman, A. S. 「Intelligent Polymers in Medicine and Biotechnology」, Macromol. Symp., 98, 645~664 (1995); また: Artif. Organs, 19, 458~467 (1995)。エンドソーム膜破壊薬剤の場合、エンドソームにおいてより低いpHの効力で膜を破壊するポリマーを用いることが好ましく、結果として送達されるべき薬剤は、リソソームによる有意な分解なしでサイトゾルに送達される。

### 【0020】

細胞膜、細胞障壁、細胞層またはリポソームの膜と比較して、エンドソーム膜の破壊に関して本明細書に記載されるが、この薬剤は、破壊を誘導する刺激が破壊されるべき細胞膜で選択的に提供され得る場合、細胞へ、細胞の外へ、または細胞層もしくは障壁（例えば、血液脳関門、またはリポソームもしくは他の脂質小胞）を横切ってエンドソーム膜以外の膜の破壊による送達のために用いられ得る。

## 【0021】

(pH感受性薬剤)

(ポリマー)

エンドソーム膜破壊剤の例としては以下が挙げられる：生理学的pHで細胞膜を破壊しないが、エンドソームの内側のpH範囲でエンドソーム膜を破壊するpH感受性ポリマー、エンドソーム中のpH範囲で疎水性になるこれらのポリマーとペプチドのランダムなコポリマー、ブロックコポリマー、またはグラフトコポリマー、ならびにリン脂質二重層を攻撃するポリマー、タンパク質およびペプチド。

## 【0022】

生理学的pH（代表的には6.8と7.5との間の範囲、および細胞内部で約7.4）で疎水的でないが、エンドソーム内のpH（5.0と6.5との間）で疎水的になる任意のポリマーが、用いられ得る。複数のカルボン酸基を含むポリマー（例えば、平均で1モノマーあたり0.5より多いカルボン酸基を有するポリマー）は、カルボン酸が脱プロトン化されるpH範囲で比較的親水性になる傾向があり、そしてカルボン酸がプロトン化されるpH範囲で比較的疎水性になる傾向がある。カルボン酸基についてのpKaは、エンドソーム中に存在するpH範囲でプロトン化される傾向があるようなpKaである。

## 【0023】

アクリル酸基およびアルキル置換アクリル酸基を含むランダムコポリマー、ブロックコポリマーおよびグラフトコポリマーが好ましい。好ましくは、アルキル基は、C<sub>1-6</sub>の直鎖アルカン、分枝アルカンまたは環状アルカンである。ポリマー物質の調製における使用のための好ましいモノマーとしては、ポリ（エチルアクリル酸）（PEAA）、ポリ（プロピルアクリル酸）（PPAA）およびポリ（ブチルアクリル酸）（PBAA）が挙げられる。これらのモノマー自体のコポリマーまたはアクリル酸を含むこれらのモノマーのコポリマーが用いられ得る。ランダムなコポリマーの例は、EA-AAである。これは、いずれかのコンポーネントの他のコンポーネントの骨格へグラフティングによって、またはもう一方のコンポーネントのブロックに結合された1つのコンポーネントのブロックのブ

ロックコポリマーとして改変され得る。

#### 【0024】

スルホン酸基を有するpH感受性ポリマーのランダムコポリマー、ブロックコポリマーまたはグラフトコポリマーもまた、合成され得る。スルホン酸基は、カチオンポリマーまたは脂質DNAキャリア上の電荷とイオン-イオン相互作用を介して強力に相互作用し、そしてカチオンキャリアを有するスルホン酸化ポリマーの物理的結合を増強するはずである。pH感受性ポリマー上のカルボキシル基は、キャリア上のカチオン性の基を有するスルホン酸基と同じく強力には相互作用すべきでない。pH感受性ポリマーは、スルホン酸化プロピルアクリルアミドモノマーであるAMP Sの封入により改変され得る。ポリマー中のペンダントの疎水性基および-COOH基に加えて、ペンダントのスルホン酸基を有するモノマーが、添加され得（例えば、スルホン化プロピルメタアクリルアミドモノマーであり、そして市販されている、AMP Sと呼ばれるモノマーを用いて）、これは、カチオン性脂質ミセルまたはリポソーム、ポリマー性カチオンおよび樹状体（*dendrimer*）を含むカチオン性DNAキャリアに対する本発明者らの膜破壊ポリマーの強力なイオン結合を可能にする。スルホン酸基 $\text{SO}_3^-$ は、 $\text{COO}^-$ 基より4級のカチオン基により強力に結合し、そしてエンドソーム内の5～6.5のpHで、 $-\text{COOH}$ 基のみが $-\text{SO}_3^-$ 基の低いpKによってプロトン化される。

#### 【0025】

このポリマーはまた、遺伝物質と複合体を形成するポリリジンおよびキトサンのようなポリカチオン性ブロックを含む他のポリマー性物質のブロックを含み得る。このようなポリカチオン性ポリマーは、当業者に周知である。このポリマーはまた、共有結合的に、1つ以上の天然に存在する多糖類（例えば、カルボキシメチルセルロースの炭化水素エステル（CMC）、炭化水素エステル、またはヒアルロン酸（HA）のアミド）と結合し得る。炭化水素は、コレステロールおよび他の疎水性分子を含み得る。

#### 【0026】

ポリマーの特徴を変えるポリマー組成物の重要な変数としては、分子量（「m

w」) およびその分布、骨格のポリマー結合の立体配置の立体規則性、コポリマー構造、分解性の結合ならびにポリマー組成物が挙げられる。例えば、ポリマーは、立体規則性の形態（例えば、立体規則性である、アイソタクチックまたはシンジオタクチック形態）あるいはいずれの立体規則性も欠くアタクチック（非立体規則性）形態で合成され得る。これは、例えば、重合の間、適切な溶媒の選択を通じて制御され得る。コポリマーは、2つ以上の異なるモノマーから形成される。これらは、ポリマー鎖の骨格にそって2つのモノマーのランダムな組織化を有するランダムなコポリマーであり得るか、またはそれらは、他のポリマーの比較的長いセグメントに付着した1つのポリマーの長いセグメントを有するブロックコポリマーであり得る。それらはまた、2つのコンポーネントの1つがコポリマー骨格を形成する他方に対して、側鎖として結合されるグラフトコポリマーであり得る。ブロックコポリマーまたはグラフトコポリマーは、脂質膜の破壊に作用するセグメント、およびイオン結合的にまたは共有結合的に結合した薬物を運搬し得る他のセグメントを含み得る。ここで、DNAがイオンの結合する薬物の例である。

#### 【0027】

実施例によって実証されたように、ランダムなコポリマーは、従来のモノマーから合成され、7.4未満のpHで膜破壊特性を有するためのコポリマーの組成物の「分子操作」を実証し得る。これらの新しいコポリマーについてのpHを下げることは、溶血における鋭い増加を示し、これは異なるポリマー組成物について異なるpHで生じるpHの低下を伴う。実施例1は、アクリル酸エチル（EA）およびアクリル酸（AA）の1:1ランダムコポリマーが、組成物中で模倣するエチルアクリル酸PEAAのホモポリマーでのように、低いpHでRBCの溶血を生じ得ることを実証する。実施例1はまた、EA-AAのランダムコポリマーならびにAAとのプロピルアクリレート（PA）のランダムコポリマー、およびAAとのブチルアクリレート（BA）のランダムポリマーが、pH5.5で異なる程度の有効な溶血性剤であることを示す。疎水性モノマー含有量が十分に増加する場合、コポリマーは、pH7.4のようなより高いpHで溶血を生じ得る。pH6.0以上、例えば7.4までで、膜破壊的な、より疎水性であるポリ

マー組成物は、超音波、電場、または電磁場のような物理的刺激の存在下で「膜貫通浸透または粘膜貫通浸透」を増強するために最も適切であり得る。

#### 【0028】

##### (ペプチド)

このプロセスにおいて、より低いpHでその電荷を失い、そして疎水的になり、これによりその構造または他の特性を変化し、エンドソーム膜を破壊するペプチドは、上記のpH感受性ポリマーを有するポリマー性ブロックとして用いられ得る。このようなペプチドの例としては、ウイルス性ペプチドおよび細菌性ペプチド（例えば、インフルエンザウイルスペプチド）、インフルエンザウイルス血球凝集素の23アミノ末端アミノ酸配列を含むペプチド、ならびにウイルスが酸性化依存様式でエンドソーム膜を不安定化する様式を模倣するペプチドが挙げられる。このようなペプチドは、エンドソーム膜を不安定化するウイルスタンパク質の構造を模倣する。例えば、インフルエンザタンパク質血球凝集素（HA）に基づくペプチドは、 $\alpha$ ヘリックス高次構造の形態を誘発するカルボキシル基のプロトン化により、より低いpHで構造変化を行うことが示されている。次いで、これらの両親媒性ヘリックスは、浸透し、そしてエンドソーム膜の破壊を生じ得る。適切なペプチドの例としては、EALA（GALAとしても公知）、反復するグルタミン酸-アラニン-ロイシン-アラニン構造を有するペプチド、およびメリチン（melittin）が挙げられる。

#### 【0029】

これらのペプチドは、ポリマー、例えば、上記のpH感受性ポリマーに組み込まれ得る。GALA-ポリアクリル酸グラフトコポリマーは、例えば、フリーラジカル重合化を介するN-アクリルオキシスクシンイミドモノマーのポリマー化により、得られたポリ（N-ヒドロキシスクシンイミド）（poly-NHS）をジメチルスルホキシド（DMSO）のような極性の非プロトン性溶媒中の所望のモル比のGALAと反応することにより、およびグラフトコポリマーを産生するために残りの非反応のNHS基を加水分解することによって調製され得る。アクリルオキシモノマーに対するGALAのモル比は、1より小さいべきであり、この結果、カルボン酸基は、最終のポリマーに存在する。残りのカルボン酸基



なしでは、pHの変化に応答するポリマーの能力は限定される。これらのポリマーへのペプチドの組み込みは、それらが他の点では有効でない場合、ペプチドの活性を劇的に増強し、そしてある場合にはペプチドに活性を与え得る。

#### 【0030】

構造的に関連したグラフトコポリマーは、異なるNHS置換モノマー（例えば、メチルアクリルオキシスクシンイミド、エチルアクリルオキシスクシンイミド、プロピルアクリルオキシスクシンイミド、ブチルアクリルオキシスクシンイミドおよびそれらの組み合わせ）を置換することにより調製され得る。

#### 【0031】

ブロックコポリマーは、メリチンの配列へ付加されたEALAの配列を合成することにより調製され得る。異なる合成ポリマーを含むブロックコポリマーが、基転移重合化技術を用いて調製され得る。2つの異なるポリマーまたはペプチドの結合体は、1つだけまたは2つの物理的混合物のいずれよりもより有効であり得る。遊離のコンポーネントからの結合体の精製は、イオン交換クロマトグラフィー、例えば、強カチオン交換を用いて実行され得る。ポリマーと送達されるべき薬剤の結合体から遊離のポリマーを除去することは有利である。負に荷電している遊離のポリマーは、イオン交換クロマトグラフィーを介して結合体から分離され得る。負の電荷は、カチオン交換マトリックスに対する抗体の親和性を変えするために働き、これはまた、結合体からの遊離の抗体を分離することを可能にする。

#### 【0032】

（リン脂質二重層破壊薬剤）

イミダゾール基を含むポリペプチドおよびポリマーはまた、より低いpHでのリン脂質二重層の攻撃により機能するエンドソーム膜破壊薬剤であり得る。イミダゾール基は、リン酸エステルおよびカルボキシルエステルを加水分解する。脂質の加水分解は、リゾリン酸および脂肪酸の形成を導き、これらの両方は、リン脂質二重層を不安定にし、そして細胞膜の破壊を起こす。従って、これらのポリマーおよびペプチドは、ポリマー性ブロックとして用いられ得、上記のpH感受性ポリマーおよびタンパク質に結合され得る。

## 【0033】

適切なポリマーおよびポリペプチドとしては、ビニルイミダゾールモノマーのユニット、ならびにヒスチジン残基を含むタンパク質およびペプチドを含む、ポリマーが挙げられる。例えば、モノマー性エチルアクリル酸は、ビニルイミダゾールとコポリマー化され得る。pH 7.4で、このポリマーは、脂質二重層と相互作用しない；しかし、低いpHではこのポリマーは、疎水性になり、そしてエンドソーム膜と相互作用し、イミダゾール基をリン脂質に接近させる。ここでこのポリマーは、リン脂質を加水分解し、そして膜の破壊を引き起こす。ポリイミダゾールは、それが半分プロトン化されそして半分脱プロトン化された場合、最大の触媒活性を有する。ポリイミダゾールのpKaは、約6.5であり、従って、エンドソームにおいてより大きい活性を有するはずである。これらのポリマーおよびポリペプチドは、上記のpH感受性ポリマーおよびペプチドを用いてブロックコポリマーまたはグラフトコポリマーを形成するために用いられ得る。

## 【0034】

(他の刺激に対する薬剤感受性)

温度、光、電気刺激、放射線、およびそれらの組み合わせを含む他の刺激に対して感受性である薬剤はまた、単独でまたはpH感受性薬剤とさらに組み合わせで用いられ得る。本明細書において記載された例証的なポリマーは、温度感受性ポリマー、pH感受性ポリマー、イオン感受性ポリマーおよび／または光感受性ポリマーである。Hoffman, A. S., *Artif. Organs*, 19, 458~467 (1995); Chen, G. H. およびA. S. Hoffman, 「*Macromol. Chem. Phys.*, 196, 1251~1259 (1995); Irie, M. およびD. Kungwachakun, *Macromol. Chem., Rapid Commun.*, 5, 829~832 (1985); およびIrie, M., *ACS Polym. Preprints*, 27 (2), 342~343 (1986)。

## 【0035】

(温度感受性ポリマー)

温度感受性ポリマーは、以下によって記載されている：Feijenら, 11

th European Conf. on Biomt ls. , 256~260 (1994) ; Monji および Hoffman, Appl. Biochem. and Biotech. 14, 107~120 (1987) ; Monji ら、Biochem. and Biophys. Res. Comm. , 172, 652~660 (1990) ; Park ら、J. Biomt ls. Sci. Polymer Ed. , 4, 493~504 (1993) ; Chen および Hoffman, Bioconj. Chem. , 4, 509~514 (1993) ; Ding ら、Bioconj. Chem. 7, 121~125 (1995) ; Chen および Hoffman, Macromol. Chem. Phys. , 196, 1251~1259 (1995) ; Takei ら、Bioconj. Chem. 4, 42~46 (1993) ; Takei ら、Bioconj. Chem. , 4, 341~346 (1993) ; (18) Takei ら、Bioconj. Chem. , 5, 577~582 (1994) ; Matsukata ら、J. Biochem. , 116, 682~686 (1994) ; Chilkoti, Bioconj. Chem. , 5, 504~507 (1994)。

#### 【0036】

多くの異なるタイプの温度応答性ポリマーの例証的な実施態様は、N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm) のポリマーおよびコポリマーである。ポリNIPAAmは、32℃ (より低い臨界溶液温度 (LCST) または曇点である) で水から沈殿する温度感受性のポリマーである (Heskins および Guillet, J. Macromol. Sci. -Chem. A2:1441~1455 (1968))。ポリNIPAAmが、アクリルアミドのようなより親水性のコモノマーとコポリマー化される場合、LCSTは、上昇される。ポリNIPAAmが、N-tert-ブチルアクリルアミドのようなより疎水性のコモノマーとコポリマー化される場合は、反対のことが起こる。AAmのようなより親水性のモノマーとのNIPAAmのコポリマーは、より高いLCSTおよび沈殿のより広い温度範囲を有し、一方、より疎水性のモノマー (例えば、N-tert-ブチルアクリルアミド) を有するコポリマーは、より低いLCSTを有し、そして通常、PNIPAAmの鋭い遷移特徴を保持していることが、よりありそうである (

TaylorおよびCerankowski, J. Polymer Sci. 13:2551~2570 (1975); Priestら、ACS Symposium Series 350:255~264 (1987); およびHeskins および Guillet, J. Macromol. Sci. -Chem. A2:1441~1455 (1968)。より高いLCSTまたはより低いLCST、および沈殿のより広範な温度範囲を有するコポリマーが、産生され得る。

。

#### 【0037】

ポリ(NIPAAm)のような温度応答性ポリマーは、例えば、米国特許第4,780,409号;ならびにMonjiおよびHoffman, Appl. Biochem. Biotechnol. 14:107~120 (1987)に記載されたように、モノクローナル抗体のような親和性分子と無作為に結合体化されている。活性化PNIPAAmはまた、プロテインA、種々の酵素、ビオチン、リン脂質、RGDペプチド配列、および他の相互作用性分子と結合体化された。

。

#### 【0038】

少量の(例えば、10モルパーセント未満)、AAcのようなpH感受性モノマーと温度感受性のNIPAAmを無作為にコポリマー化することにより、コポリマーは、温度およびpH感受性の両方を表す。そのLCSTは、モノマーがイオン化されないpHでは、ほとんど影響されないが(時には2、3度低下される)、pH感受性基がイオン化される場合は、LCSTは劇的に上昇される。pH感受性モノマーがより高い含量で存在する場合、温度感受性コンポーネントのLCST応答は、「排除」され得る(例えば、相分離は100℃までおよび100℃より上では見られない)。pHおよび温度の両方の遷移を独立的に保持する、pHおよび温度感受性のモノマーのグラフトコポリマーおよびブロックコポリマーが合成され得る。Chen, G. H. およびA. S. Hoffman, Nature, 373, 49~52 (1995)。

#### 【0039】

(他の環境刺激に感受性のポリマー)

イオン濃度、イオン親和性および異なる溶解性のような他の環境刺激に感受性のポリマーは、Fujimuraら、Biotech. Bioeng., 29, 747~752 (1987); NguyenおよびLuong、Biotech. Bioeng., 34, 1186~1190 (1989); Taniguchiら、Biotech. Bioeng., 34, 1092~1097 (1989); Monjiら、J. Biomater. Sci. Polymer Ed., 5, 407~420 (1994); ChenおよびHoffman、Biomater., 11, 631~634 (1990); Staytonら、Nature, 378, 472~474 (1995) によって報告されている。

#### 【0040】

カラゲナンのような多糖類は、例えば、 $K^+$ または $Ca^{++}$ のような特異的なイオンへの曝露の関数として、ランダムな高次構造から規則的な高次構造までそれらの高次構造を変化する。アルギン酸ナトリウムの溶液は、 $Ca^{++}$ への曝露によりゲル化され得る。他の特異的なイオン感受性ポリマーとしては、ヒスチジンまたはEDTAなどのようなペンダントなイオンキレート基を有するポリマーが挙げられる。脂質基またはリン脂質基もまた、カチオン性脂質ミセルまたはリポソームDNAキャリア系へのその組み込みを容易にするため、膜破壊性ポリマー骨格に化学的にまたはイオンの結合され得る。これは、例えば、エステル基を形成するために $-COOH$ のペンダントな基に脂肪アルコールを結合体化することにより、またはアミド基を形成するために $-COOH$ のペンダントな基へのジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンの結合体化により行われ得る。脂質基はまた、ポリマーの末端の基に化学的に結合され得る。上記のスルホン酸化されたモノマーAMP Sが膜破壊的ポリマーに用いられた場合、次いで、カチオン性脂質薬物キャリア系へのその挿入を容易にするために、ポリマーへカチオン性脂質をイオン結合的に複合体化し得る。

#### 【0041】

(光感受性ポリマー)

光感受性ポリマーは通常、ポリマーの主鎖から垂れ下がったまたはそれに沿った発色団 (chromophoric group) を含み、そして光の適切な

波長に曝露された場合に、トランス形態からシス形態（これは、双極性およびより親水性であり、そして可逆性ポリマーコンフォメーション変化を生じ得る）へと異性化され得る。他の光感受性化合物はまた、光刺激によって、比較的無極性で疎水性の非イオン化状態から、親水性のイオン化状態へと変換され得る。同じポリマーに複数の環境感受性（例えば、温度感受性および光感受性）を、共重合によって組み入れることはまた可能である。

#### 【0042】

垂れ下がった光感受性の基のポリマーの場合、芳香族アゾ化合物またはスチルベン誘導体のような光感受性色素は、反応性モノマーに結合され得（例外としては、すでにビニル基を有するクロロフィリン（chlorophyllin）のような色素がある）、次いで他の従来のモノマーとホモ重合化もしくは共重合化され得、または上記の鎖転移重合化を使用して温度感受性モノマーもしくはpH感受性モノマーと共重合化され得る。光感受性の基はまた、異なる（例えば、温度—）反応性ポリマーの1つの末端に結合され得る。そのような色素接合モノマーの合成についての多くのプロトコールが公知である。

#### 【0043】

光感受性の化合物は、光の特定の波長を吸収した場合に、異性化またはイオン化されて自身を疎水性から親水性コンフォメーションへと変換する色素分子であり得るか、または光の特定の波長を吸収した場合に熱を発する他の色素分子であり得る。前者の場合、異性化は単独で鎖の拡大または破壊を生じ得るが、一方で後者の場合、このポリマーは、ポリマーがまた温度感受性でもある場合にのみ沈殿する。

#### 【0044】

光感受性ポリマーは通常、ポリマーの主鎖に垂れ下がった発色団を含む。使用されている代表的な発色団は、芳香族ジアゾ色素である（Ciardelli、Biopolymers 23:1423-1437（1984）；Kungwat chakunおよびIrie、Makromol. Chem. Rapid Commun. 9:243-246（1988）；LohmannおよびPetrak、CRC Crit. Rev. Therap. Drug Carrier

S y s t e m s 5 : 2 6 3 ( 1 9 8 9 ) ; M a m a d a ら、M a r c r o m o l e c u l e s 2 3 : 1 5 1 7 ( 1 9 9 0 ) 。このタイプの色素が350-410 nmのUV光に曝露される場合、より疎水性である芳香族ジアゾ色素のトランス形態は、双極性でより親水性のシス形態へと異性化される。そしてこれはポリマーのコンフォメーション変換を生じ得、骨格への色素結合の程度および骨格の本体の水可溶性に依存して、混濁したポリマー溶液の清澄化を生じる。約750 nmの可視光への曝露は、現象を逆転させる。親水性から疎水性状態への垂れ下がり基の変換はまた、各鎖にそれらのコンフォメーションの拡大または破壊を生じさせ得る。それらの光感受性の色素はまた、色素の光誘導性異性化に起因するコンフォメーション変換が、ポリマー鎖のコンフォメーション変換を生じるように骨格の主鎖に沿って組み込まれ得る。ポリマー主鎖が光感受性の基（例えば、アゾベンゼン色素）を含む場合、その光刺激状態は事実上収縮し、そして光誘導性異性化に際して、より親水性になり得る。

#### 【0045】

光は、例えばカチオン性色素を中性でより疎水性の色素に変換し、それによってアニオン性DNAを放出し、そしてまたエンドソーム膜を破壊し得るより疎水性の分子を産生する刺激物として使用され得る。

#### 【0046】

（膜破壊を増強するための処理）

上記のように、膜破壊剤は、輸送が所望される細胞または細胞障壁に送達される。この箇所では、この部位におけるpH変換のような刺激、または光もしくは温度変化のような外因的刺激が適用され、そして膜が破壊される。破壊はまた、処理の有効性を増強する物理的処置（例えば、超音波、電場、電磁場、イオン導入、エレクトロポレーション、またはそれらの組み合わせの適用）と膜破壊剤の組み合わせ効果に起因して生じ得る。

#### 【0047】

（超音波）

超音波は、代表的には市販のデバイスを使用して適用される。これらのデバイスは、約20 kHzと10 MHz との間の治療的範囲を有し、そして好ましくは

3 MHz未満での局所的適用について使用される。空洞化を誘導することが所望される1つの実施態様において、低強度の超音波（US）場（空洞化を生成する超音波場）が、膜破壊ポリマーの存在下にある懸濁液中の細胞に適用される。実施例によって実証されるように、このポリマーは、細胞膜破壊および超音波単独で誘導される場合以上の分子の放出を有意に増強する。膜破壊剤の有効な用量は、空洞化を測定し（聴覚上、またはフリーラジカルもしくはヨウ素のような化学的トレーサーの生成により）、あるいは細胞内からの、もしくは細胞中の薬物のエンドサイトーシスおよび細胞内輸送による物質の輸送または放出を測定することにより、経験的に（empirically）決定され得る。皮膚はわずかに酸性であるので、空洞化する超音波場の存在下での薬物の経皮的透過を特異的に促進するためにポリマー組成物を分子的に操作することが可能であるはずである。

#### 【0048】

超音波は、連続的に適用され得、またはパルス状であり得る。超音波は、懸濁物中の細胞に、または組織中の細胞に直接的に、もしくは経皮的に、膜破壊剤の投与前、投与中、もしくは投与後に、適切な超音波媒体を使用して適用され得る。

#### 【0049】

##### （電場）

輸送を増強するための、イオン導入、エレクトロポレーション、または電場の他の適用は周知技術である。これらはまた、膜破壊を増強するために膜破壊剤の投与との組み合わせにおいて使用され得る。電場は、低電圧で連続的な電場として、または高電圧のパルス状の電場として適用され得る。電場は、皮膚または細胞を通る荷電した分子の電気泳動の流れ（flow）を誘導するために適用され得る（イオン導入）。エレクトロポレーションは、細胞層または細胞膜を破壊するための電場の使用である。

#### 【0050】

##### （放射線）

電離放射線および光力学的治療を含む照射のタイプはまた、膜破壊剤、特に光



応答性の膜破壊剤との組み合わせにおいて有用であり得る。光力学的治療において、正確な出力および波長の光が、次いで吸収されたエネルギーを利用して酸素（これは通常、一重項酸素に対して三重項状態で存在し、これは強力な細胞キラーである）に変換する場合に、光増感剤によって吸収される。後者は、腫瘍細胞への細胞性治療薬物（cytotoxic drug）の輸送において特に有効である。

### 【0051】

#### （II．診断剤および治療剤）

任意の治療剤、予防剤、または診断剤は、細胞およびエンドサイトーシスへの投与後、治療剤または診断剤の活性で連結が阻害されない限り、エンドソーム膜破壊剤にイオンのもしくは共有結合的に、直接的もしくは間接的に連結され得る。薬剤は、直接的にエンドソーム膜破壊剤に連結され得るか、あるいはエンドソーム膜破壊剤に結合された別の化合物（例えば、エンドサイトーシス増強剤、標的化合物、リソソーム機能を減少する化合物）、または治療剤もしくは診断剤に結合するエンドソーム膜破壊剤に付着されたリガンドに結合する別の化合物（例えば、核酸に結合するポリカチオン性ポリマー）を介してエンドソーム膜破壊剤に間接的に結合され得る。

治療剤および診断剤は、ヌクレオシド、ヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド、タンパク質もしくはペプチド、ポリサッカリドおよび他の糖、合成的無機化合物および有機化合物、金属もしくは放射性化合物、または分子であり得る。

### 【0052】

ヌクレオシド、ヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、天然に生じるヌクレオチドもしくは改変されたヌクレオチドのオリゴマーまたはポリマーを含み、これは天然に生じるかもしくは改変されたプリンおよびピリミジン塩基、2' および3' 改変体（例えば、O-アルキル、ハロおよびアジ改変体）、ならびにリン酸結合の改変体（例えば、リン酸結合に対するホスホロチオ酸結合の置換）を含む。オリゴヌクレオチドは、RNAならびに一本鎖および二本鎖のDNA核酸配列を含む。分子は、転写、遺伝子、アプタマー（aptamer）、三重鎖ヘリックス形成化合物、リボザイム、およびリボザイムについての外部ガイド配列

(external guide sequence)、DNAザイム (DNAzyme)、DNAプラスミド、およびウイルスベクターを阻害するために、相補的DNAに結合するアンチセンス分子であり得る。多くのプラスミドおよびウイルスベクターが市販され、そして多くが（特に、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクター）、臨床試験において使用された。ベクターは、送達される遺伝子を同時に、そしてその物質が送達される細胞中の発現について適切な調節剤の制御下で通常組み込む。遺伝子は、マーカー遺伝子、欠損もしくは欠落タンパク質をコードする遺伝子、または致死タンパク質をコードする遺伝子であり得る。

### 【0053】

細胞を殺傷するための好ましい化合物としては、リシン、ジフテリア (diphtheria) 毒素のB鎖、およびアデノウイルス、インフルエンザウイルス、およびGALAペプチドに由来するペプチドのような糖タンパク質に基づいた毒素が挙げられる。代表的な毒素はリシンである。リシンは、天然に生じる糖タンパク質のヘテロダイマーであり、これは60S真核生物リボソームサブユニットを不活性化し得るN-グリコシダーゼ活性を有するA鎖、および細胞表面分子（例えば、リシンBについてのガラクトース残基）に結合し得るB鎖を含有する。A鎖は、殺傷されるべき細胞についてのサイトゾルリボソームに送達されなければならない。これらの毒素は、B鎖を介して実質的に全ての細胞に結合するため、これらの毒素は有効な化学治療剤に必要とされる特異性に欠く。他の毒素はリボシル化し、それによって伸長因子2（これはタンパク質合成に必要とされる）を不活性化する。他の代表的な毒素としては、アブリン、モデシン (moderatin)、Pseudomonas体外毒素、ブリオジン (bryodin)、ヤドリギ (mistletoe) レクチン、シガ毒素 (Shiga toxin)、Escherichia coli不安定毒素 (labile toxin)、百日咳毒素、コレラ毒素、炭疽毒素、ビスクミン (viscumin)、サポリン (saporin)、ゲロニン (gelonin)、モモルディン (momordin)、トリコサンチン (trichosanthin)、およびヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質が挙げられる。毒素は、標的化された細胞について

特異的な抗体に結合され得る。ヘパリンのようなポリサッカリドもまた使用され得、ここではポリサッカリドは細胞表面上のレセプターに結合する。広範な範囲の分子量（例えば、約100と500,000ダルトンとの間）を有する化合物が使用され得る。

#### 【0054】

送達される薬剤が毒素であり、そしてエンドサイトーシス増強剤が殺傷される細胞に標的化された抗体である場合、生じる結合体は、サイトゾルに有効に送達され得る免疫毒素である。抗体のFc領域に存在する炭化水素部分は、結合について都合の良い位置にある。酸化される場合、これらの炭化水素領域はアルデヒド基を生じる。このアルデヒド基は、タンパク質上の他の場所には存在しない。この領域はエピトープ結合部位から離れて存在するため、それは抗原結合との妨害を最小化する。さらに、この領域は、引き続く結合について利用可能な、容易に接近可能な結合部位である抗体のリジン残基を残す。リシンのような毒素のA鎖は、公知の結合化学を使用して（例えば、ヘテロ二官能性架橋N-スクシニミジル-3-(2-ピリジリルジチオプロピオン酸) (SPDP) を使用して、または還元性アミノ化により）、抗体に共有結合され得る。細胞毒素、タンパク質リシンA (RTA) およびpH-感受性ポリマー、PPAAを用いた細胞培養の研究を、実施例において記載する。RTAがそれ自身によって細胞培養物に添加される場合、おそらく毒素のリソソームへの細胞内輸送に起因して、細胞死は全く注意されなかった。PPAAがRTAと物理的に混合される場合、混合物の濃度の増加（3/1 PPAA/RTAの定率）は、細胞死を増加へと導く。ポリマー自身は、細胞に対して毒性でない。これらの観察は、ポリマーがおそらくエンドソーム膜を破壊することによって、毒物の作用を増強するために細胞内で働いていることを示す。

#### 【0055】

実施例は、IgG結合体およびビオチン化されたPEAA-ストレプトアビジン複合体「結合体」の有効性をさらに実証し、膜破壊性ポリマーがタンパク質に結合された場合でもなお活性であることを示す。実施例はまた、PPAAが、溶液中で遊離している場合と同様に、ストレプトアビジンと結合される場合、溶血

性であることを実証する。

#### 【0056】

任意の種々の診断剤が使用され得る。それらは、単独で投与され得るか、または上記のような1つ以上の治療剤と合わされ得る。この薬剤は、放射性標識、蛍光性標識、酵素性標識され得、および／または色素または磁性化合物、ならびにX線、超音波、磁気共鳴画像法（「MRI」）、陽電子放出断層撮影（PET）、コンピュータ補助断層撮影（「CAT」）、シングル光子放出（single photon emission）コンピュータ化断層撮影、蛍光透視法、もしくは他の一般的に使用される診断用技術を使用して検出され得る他の物質を含み得る。MRIにおける造影剤としての使用のために適切な物質の例としては、現在入手可能なガドリニウムキレート（例えば、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）およびガドペンテ酸ジメグルミン、ならびに鉄、マグネシウム、マンガン、銅およびクロムのキレート）が挙げられる。CATおよびX線について有用な物質の例としては、ヨウ素に基づく物質（例えば、ジアトリゾア酸およびイオタラメート（iothalamate）に代表されるイオン性モノマー、非イオン性モノマー（例えば、イオパミドール、イソヘキサール（isohexal）、およびイオベルソル）、非イオン性ダイマー（例えば、イオトロールおよびイोजキサノール）、ならびに、イオン性ダイマー（例えば、イオキサグレート））が挙げられる。膜破壊剤と組み合わせられ得る有用な超音波造影剤としては、診断用超音波で画像化された場合に優先的に鮮明となる音響造影剤が挙げられる。

#### 【0057】

放射性化合物はまた、治療的に使用され得る。放射性同位体としては、インジウム同位体（「In」）、ヨウ素同位体（「<sup>131</sup>I」）、およびイットリウム同位体（「<sup>90</sup>Y」）が挙げられ、これらは細胞毒性であり得る。

#### 【0058】

これらの物質は、標準的な化学技術を使用して、またはいくつかの場合においては組換え技術を使用して（例えば、融合タンパク質を作製するため J. Clin. Oncol. 14, 1383-1400 (1996)）、結合体に結合さ

れ得る。共有結合は、当業者に周知の化学反応を使用して形成され得る。例えば、糖タンパク質はよく、酸化されてアルデヒド基を提供し得るサッカリド部分を有する。アルデヒド基は、アミンと反応してシッフ塩基を形成することが公知であり、次いでこれは還元的アミノ化として公知のプロセスにおいて、シアノトリヒドロホウ酸ナトリウム (sodium cyanoborohydride) で還元され得る。アミン基およびカルボン酸基を有するペプチド、カルボン酸基を有するポリマー、そしてイミダゾール基およびエンドソーム内のpH範囲でリン脂質膜を加水分解する他の基を有するポリマーならびにペプチドは、当業者に周知の方法を使用して共有結合的に連結され得る。薬剤は、無水物、エステル、オルトエステル、アミド、シッフ塩基またはジスルフィド結合のような分解性の結合を介して結合され得る。

#### 【0059】

薬剤は、エンドソーム膜破壊剤に共有結合的に結合される複合体形成物質とイオンの結合され得る。オリゴヌクレオチドおよび他の負に荷電した物質（例えば、アントラサイクリン (anthracycline) 抗腫瘍剤）は、ポリカチオン性物質と複合体を形成することが公知である。適切なポリカチオン性物質には、合成および天然のポリアミン（例えば、キトサン、ポリ（エチレンイミン）（PEI）、ポリ（N, N-ジメチルアミノエチルメタクリル酸）（PDMAEMA）、ポリアミドアミン（PAMAM）、ポリ（ビニルピリジン）、ポリ（イミダゾール (imidazole) ）、ポリ（ビニルアミン）（ポリビニルホルムアミドの加水分解によって得られる）、これらのアミンの四量化 (quaternize) された形態、およびより低いpHで正に荷電されるカチオン性官能基を有する星状のデンドリマー (starburst dendrimer) ）が挙げられる。ポリカチオン性物質は、エンドソーム膜破壊剤に共有結合的にまたはイオンの結合され得、そして負に荷電した送達される薬剤とイオンの複合体化され得る。複合体は、エンドサイトーシスを安定化しかつ増強し得る。挿入化合物もまた、核酸の送達のために使用され得る。例えば、PEAAはエチジウムブロマイドに共有結合的に連結され得る。他の挿入剤としては、いくつかのポルフィリンおよびフタロシアニンが挙げられる。

## 【0060】

主に、細胞への輸送に関して記載されたが、同じ技術はまた、細胞からまたは細胞層を通過する輸送を増強するために使用され得る。例えば、間隙液中もしくはサイトゾル内または膜障壁を通過する代謝物または他の分析物の輸送は、破壊剤の投与および適切な刺激物（単数および複数）（例えば、光、超音波、電場、または温度変化）の投与により増強され得る。

## 【0061】

## (III. エンドサイトーシス増強剤および標的化剤)

エンドサイトーシス増強剤は、イオンのまたは共有結合的に、直接的または間接的に、エンドソーム膜破壊剤に結合され得る。これらのエンドサイトーシス増強剤は、膜破壊剤と共に単独で、または膜破壊剤およびエンハンサー（例えば、超音波、電場、および／または刺激物）との組み合わせにおいて使用され得る。例示的なエンドサイトーシス増強剤としては、抗体、ストレプトアビジン-ビオチン、およびトランスフェリンレセプターペプチドのような膜レセプターリガンド（これらは、薬剤が送達される細胞に、エンドソーム膜破壊剤を非特異的に結合する）；ポリカチオン；ならびにホスホリパーゼが挙げられる。細胞表面上のレセプターと相互作用する他のリガンドとしては、トランスフェリン、ガラクトース、アシアロオロソムコイド、インスリン、サイトカイン（例えば、インターロイキン2）、および増殖因子（例えば、上皮増殖因子、血小板由来成長因子、および神経発育因子）が挙げられる。エンドソーム膜破壊剤およびエンドサイトーシス増強剤の結合体の例としては、IgGに直接的に結合したポリ（エチルアクリル酸）（PEAA）、およびリガンド（例えば、IgG）に結合したストレプトアビジンが挙げられ、次いでビオチン化されたPEAA（B-PEAA）と複合体化されて、エンドソーム膜破壊剤をエンドサイトーシス増強剤と間接的に結合する。

## 【0062】

エンドサイトーシスおよび／または膜破壊を増強するように思われる他の化合物はまた、処方物中に含まれ得る。ポリカチオン（例えば、ポリリジン）は、オリゴヌクレオチドのような負に荷電した物質との組み合わせにおいて使用される

場合に、特に有効である。別の実施態様において、エンドソーム膜破壊剤は、イオンのまたは共有結合的に、直接的または間接的に、ホスホリパーゼ、神経アミダーゼおよびスフィンゴミエリナーゼ (s p h i n g o m y l i n a s e) のような酵素 (これらは、脂質を加水分解し得、それによって膜破壊をさらに増強し得る) と結合される。適切な酵素としては、ヒト胎盤から単離されたスフィンゴミエリナーゼおよびリソソーム由来のホスホリパーゼ A 2 が挙げられる。膜破壊剤またはエンドサイトーシス増強剤に直接的には連結しないが、これらの特性を有することが公知である他の化合物 (例えば、グリセロール) もまた、処方物中に含まれ得る。

#### 【0063】

特定の細胞型の表面上に見出される分子の例としては、細胞型特異的抗原 (これは、種、個体または起源の組織に特異的であり得る)、ウイルス抗原 (ウイルス性感染された細胞の場合)、および腫瘍抗原が挙げられる。これらの分子は、抗体、好ましくはモノクローナル抗体、より好ましくはヒトモノクローナル抗体、もしくはヒト化抗体を使用して、またはレセプター特異的リガンドを使用して、標的化され得る。腫瘍抗原は、抗体の結合した化学治療剤または細胞毒性剤についての標的として有用である。これらは、多くの場合、腫瘍細胞についての特異的なマーカーでない；むしろ、それらは正常組織と比較して腫瘍細胞において過剰に発現され、すなわち、それらは正常な胎児組織に関連して [C E A (G o l d r a, J. E x p. M e d. 1 2 2, 4 6 7 - 4 8 1 (1 9 6 5))、A F P (A b e l e v, A d v. C a n c e r R e s. 1 4, 2 9 5 - 3 5 0 (1 9 7 1)) ]、または成人におけるその器官の正常な前駆体細胞 (C E A) に関連して見出される。腫瘍抗原は、腫瘍細胞膜上の腫瘍間隙または腫瘍細胞の細胞質もしくは核中に局在化され得る。

#### 【0064】

循環において細胞上で見出される抗原、および腫瘍新生血管形成上で発現される抗原は、静脈内 (i. v.) 投与試薬に、容易に利用される。組織または腫瘍細胞の表面上で発現され得る抗原は、病変内 (i. l.) または腹腔内 (i. p.) 投与結合体に、容易に利用される。腫瘍間隙内に分泌される抗原は、i. l

。投与に最も利用される。

#### 【0065】

膜破壊剤は、スペーサーアーム（例えば、ポリエチレングリコール）を介して細胞リガンドに結合され得る。これは、エンドソーム膜破壊剤の有効性を増強し得る。破壊剤の有効性は、PEGスペーサーアームを介してそれらをポリマーに結合または融合することにより、破壊ポリマー骨格（例えば、GALA-g-PAA）に融合する。

#### 【0066】

##### （IV．リソソーム機能を最小化する化合物）

エンドソーム破壊についての膜破壊剤を含む処方物はまた、リソソーム機能を最小化する有効量の化合物を含み得る。送達される薬剤の効力を妨害することなくリソソーム機能を最小化する任意の化合物、またはエンドソーム破壊剤が使用され得る。例としては、一般的にリソソーム酵素インヒビターが挙げられる。他の適切な化合物としては、アマンタジン、ベラパミル、クロロキン、クロルプロマジン、モネンシン、および塩化アンモニウムが挙げられる。

#### 【0067】

##### （V．キャリア）

本明細書中に記載される組成物は、送達される薬剤の活性を破壊しない任意の方法を使用して、ナノ粒子（nanoparticle）およびマイクロ粒子（microparticle）（ミクロスフェアおよびマイクロカプセル、リポソーム、脂質小胞、乳剤、またはポリカチオン性複合体を含む）中に組み込まれ得る。他の実施態様において、破壊剤は、カチオン性脂質または粒状キャリアとポリマーの、イオンの、共有結合的、もしくは疎水的結合によって結合される。

1つの好ましい実施態様において、エンドソーム破壊剤は、疎水性であるポリマーであり、または、例えばリポソーム、特にカチオン性リポソーム中に組み込まれ得るコレステロールとの結合によって疎水的に改変されたポリマーである。その結果、このポリマーは事実上、送達系の一部である。これらは膜破壊剤とともに単独で、または膜破壊剤およびエンハンサー（例えば、超音波、電場、および／または刺激物）との組み合わせにおいて使用され得る。



## 【0068】

マイクロ粒子およびナノ粒子は、単一および二重エマルジョン溶媒気化、スプレー乾燥、溶媒抽出、溶媒気化、相分離、単一および複合コアセルベーション、界面重合、ならびに当業者に周知の他の方法を使用して、調製され得る。薬物送達についてのミクロスフェアを作製するための改良された方法は、例えば、Dubrow, M. 編「Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy」、CRC Press、Boca Raton、1992に記載されるように文献に記載される。

## 【0069】

組成物はまた、他の生理学的に受容可能なビヒクル（例えば、リン酸緩衝化生理食塩水）、または局所的投与、局在的投与、間隙性投与もしくは静脈内投与についての他のビヒクルにおいて投与され得る。

## 【0070】

## (B. 投与方法)

この組成物は、軟膏もしくはスプレーとして、直接的に、局所的に懸濁物中の細胞に投与され得るか、または全身的に、局所的に（病変内に）もしくは局在的に動物に投与され得る。有効な用量は、細胞活性における変化により（例えば、細胞死を測定することにより、診断剤の検出により、または粒子分析物の輸送を測定することにより）決定され得る。組成物は、単回ボースにおいて、連続的にまたは反復的に投与され得る。

## 【0071】

好ましい実施態様において、この組成物は、インビトロで細胞に投与される。例えば、幹細胞は、身体から取り出され、インビトロで細胞内に遺伝物質を導入するために、この組成物単独で、またはこの組成物と超音波のようなエンハンサーとを組み合わせで処理される。次いで、処置されるべき患者に再び導入される。別の例において、細菌細胞はこの組成物で処理され、そして、膜破壊を引き起こすために刺激が適用される。この刺激は、pHにおける変化であり得る。

## 【0072】

実施例において記載されるように、エンドソーム膜の破壊を予測する試験は、赤血球溶血試験である。エンドソーム膜破壊の特性は、赤血球の溶解の程度を決定することによって評価される。溶血アッセイは、少量（例えば、1%溶液、約0.005ml中の500 $\mu$ gまたは0.5gの組成物）の組成物の溶液を、およそ $10^8$ 細胞（約1ml中）の赤血球懸濁液に添加し、そして、37℃で1時間インキュベートすることを包含する。インキュベーション後、細胞を遠心分離し、そして上清の吸光度を、541nmにおいて測定する。これは、溶解された細胞の数を反映する。

#### 【0073】

さらなる研究が所望される場合、Geisow, M. J. Fluorescein Conjugates as Indicators of Subcellular pH. Experimental Cell Research, 150:29~35 (1984)で議論されるようなpH依存性の発蛍光団を用いて組成物を標識し得る。細胞による結合体のエンドサイトーシス、およびこれらの輸送は、発蛍光団の可視化によって追跡される。最大発光に基づいて、この組成物が、低いpHの環境下（エンドソーム）にあるか、または生理的なpHの環境下（細胞質）にあるか否かを、決定し得る。

#### 【0074】

エンドサイトーシス増強剤がこの組成物中に含まれている、これらの実施態様において、これらの実験は、薬剤の親和性が結合体化によって変化したか否か、ならびにポリマーの膜破壊能がエンドソームの放出を刺激することに有効であるか否かを決定し得る。

#### 【0075】

本明細書中に記載される組成物および方法は、以下の限定されない実施例を参考にして、より良く理解される。

#### 【0076】

（実施例1：PEAA-62K；PPAAのpH感受性の評価）

（目的）

本研究の目的は、アクリル酸-アクリル酸ブチルおよびアクリル酸-アクリル

酸プロピルのランダムコポリマーが、エンドソーム放出剤として作用する可能性を有するか否かを決定することであった。これは、エンドソームのpH (5.5) および生理的なpH (7.4) における、上記のポリマーの溶血活性を測定することによって決定され得る。

#### 【0077】

##### (プロトコル)

(I) ポリマー合成：アクリル酸-アクリル酸プロピルおよびアクリル酸-アクリル酸ブチルのポリマーおよびランダムコポリマーを、種々のモノマー供給比で、バルク中で、開始剤としてAIBNを使用して、フリーラジカル重合によって合成した。コモノマー供給比を、関連した図中に示す。ポリマーを、エーテル沈降によって精製した。

#### 【0078】

(II) 溶血アッセイ：新鮮なヒト血液を、EDTAを含むバキュテイナー (vacutainer) 中に単離し、150mM NaClで3回洗浄し、そして、記載されるように、pH 5.5もしくはpH 7.4のいずれかであるPBS緩衝液、またはMES緩衝液中に、 $10^8$  細胞/mlの濃度で、再懸濁した。ポリマーを、DMSOかまたはpH 10の緩衝化PBSのいずれかに溶解した。次いで、適切な容量のポリマー溶液をRBC溶液に添加し、そして、37度で1時間インキュベートした。次いで、この細胞を遠心分離し、そして溶血の程度を、541nmにおける上清の吸光度を測定することによって決定した。100%の溶解を、脱イオン水中で赤血球を溶解することによって決定した。コントロールは、ポリマーを含まない緩衝液中に懸濁されたRBCであった。

#### 【0079】

平均分子量62,000の標識化ポリ(エチルアクリル酸) (PEAA-62K) (500  $\mu$ g) を、pH 5.1の100mM MESまたはpH 7.4の100mM リン酸ナトリウム中でおおよそ $10^8$  細胞の赤血球懸濁液に添加し、そして、37℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後、これらの細胞を遠心分離し、541nmにおける上清の吸光度を測定した。吸光度は、溶解された細胞の数を反映する。コントロールは、適切な緩衝液中におけるおおよそ1

<sup>8</sup> O 細胞であった。

【0080】

図1Aに示されるように、PEAAは、pH5.1で、ほぼ100%の赤血球溶解を達成したが、pH7.4では5%未満の溶解を達成した。従って、このポリマーは、エンドソーム膜破壊剤として有用である。

【0081】

PPAA (3  $\mu$ g) を、同じ実験計画を使用して評価した。赤血球を、pH6.1またはpH7.4のいずれかの100mM リン酸ナトリウム中で懸濁させた。

【0082】

図1Bに示されるように、PPAAは、pH6.1で、ほぼ100%の赤血球溶解を達成したが、pH7.4では10%未満の溶解を達成した。従って、このポリマーは、エンドソーム膜破壊剤として有用である。

【0083】

同じ実験計画を、PEAAおよびPPAAを比較するために、pH6.1の緩衝液中で、赤血球を用いて、記載されるように使用した。

【0084】

図1Cに示されるように、PEAAよりも有意に少ないPPAAがpH6.1で実質的な溶解を達成するために必要とされた。およそ100%の溶解は、約3  $\mu$ gのPPAAを用いて達成された。従って、PPAAは、PEAAよりも有意に良好なエンドソーム膜破壊剤である。

【0085】

PBAAが赤血球を溶解する能力を、上記と同じ実験計画を使用して、pH6.1およびpH7.4で、PPAAのその能力と比較した。

【0086】

この結果を、図1Dに示す。PBAAは、pH7.4において、5  $\mu$ gの濃度までは5%未満の溶解を示した。pH6.1において、PBAAおよびPPAAは、匹敵するほどの溶解を示し、約5  $\mu$ gの濃度で約100%の溶解を生じた。このデータは、PBAAおよびPPAAが、エンドソーム膜破壊剤として同様の

効力を有することを示す。

#### 【0087】

E A-A A (アクリル酸エチルおよびアクリル酸のランダムコポリマー) が赤血球を溶解する能力を、上記と同じ実験計画を使用して、p H 5. 5におけるP E A Aのその能力と比較した。

#### 【0088】

この結果を、図1 Eに示す。このデータは、E A-A Aコポリマーが、赤血球を加水分解する際に、p H 5. 5で、P E A Aよりも効果が低かったことを示し、これは、10  $\mu$  gの濃度でのP E A Aについての約55%の溶解と比較して、10  $\mu$  gの濃度で約35%の溶解を達成した。

#### 【0089】

次いで、溶解の濃度依存性を決定した。図1 Fは、p H 5. 5でのA A c / P A : 50% A A c / 50% P A、40% A A c / 60% P A ; および60% A A c / 40% P Aのコポリマーの溶解パーセントを示す。図1 Gは、p H 5. 5でのA A c / B A : 50% A A c / 50% B A ; 75% A A c / 25% B A ; および90% A A c / 10% B Aのコポリマーの溶解性パーセントを示す。

#### 【0090】

これらの結果は、アクリル酸プロピルーアクリル酸のランダムコポリマーがp H 5. 5で溶血性であり、最も溶血性のあるコポリマーが50 / 50コポリマーであり、10<sup>8</sup>のR B Cの54%の溶血を生じるために50  $\mu$  gを必要とすることを示す。このアクリル酸プロピルーアクリル酸のコポリマーは、p H感受性溶血を示し、そして、50 / 50コポリマーは、p H 5. 5における54%の溶血とは対照的に、p H 7. 4において10<sup>8</sup>のR B Cの30%しか溶血を生じない。

#### 【0091】

アクリル酸ブチルーアクリル酸のコポリマーは、非常に強力な溶血剤である。10  $\mu$  gの50 / 50コポリマーは、p H 5. 5において10<sup>8</sup>のR B Cの60%を越える溶血を生じる。アクリル酸ブチルーアクリル酸のコポリマーはまた、

pH感受性である。10  $\mu$ gの50/50コポリマーは、pH 7.4において10<sup>8</sup>のRBCの10%未満の溶血を生じる。

#### 【0092】

アクリル酸-アクリル酸ブチルのランダムコポリマーおよびアクリル酸-アクリル酸プロピル型のコポリマーの両方はpH感受性溶血活性を示し、そしてpH 7.4よりもpH 5.5において溶血を誘導する際に、有意により効果的である。さらに、上記のランダムコポリマーの溶血活性およびpH感受性は、モノマー組成を改変することによって、合理的に設計され得る。

#### 【0093】

(実施例2：EALAのpH感受性と、EALA/ポリアクリル酸結合体のpH感受性との比較)

EALAが赤血球を溶解する能力を、37℃で20分間インキュベートした、100mMの二塩基性NaPO<sub>4</sub>中のおよそ10<sup>7</sup>の赤血球を使用して、pH 5.0において、EALA/ポリアクリル酸結合体のその能力と比較した。EALAおよびPAAの物理的混合物もまた、試験した。

#### 【0094】

これらの結果を、図2に示す。単独のEALAペプチド、ならびにEALAとPAAとの物理的混合物は、ごく少量の溶解を示したが、この結合体は、約100  $\mu$ gの濃度で、約70%の溶解を生じた。

#### 【0095】

(実施例7：PEAAのpH感受性とIgG/PEAA結合体のpH感受性、およびIgG単独のpH感受性の比較)

PEAA、IgG/PEAA結合体およびIgG単独が赤血球を溶解する能力を、100mMの二塩基性リン酸ナトリウム中のおよそ10<sup>8</sup>の赤血球細胞を使用し、そして37℃で1時間インキュベートする、pH 5.0での溶血アッセイを実施することによって比較した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド(EDC)を使用して、ウサギ免疫グロブリンG(IgG)に対してPEAAを結合体化した。EDCは、PEAAに対してカルボキシル基と反応し、アミン反応性中間体を形成し、次いでこの中間体は

I g G上のリジンアミン基と反応する。I g Gを、100mM 過ヨウ素酸ナトリウムを使用して酸化し、炭化水素部分に反応性アルデヒド基を生じた。結合体をアミン終結P E A Aの末端アミン基とI g G上のアルデヒド基との間の Schiff塩基形成によって実現した。この結合を、5M シアノトリヒドロホウ酸ナトリウムを使用して還元し、P E A AおよびI g Gの共有結合した結合体を生成した。P E A A : I g Gのモル比は、2 : 1であった。

#### 【0096】

I g G / P E A A結合体が、赤血球を溶解する能力を、遊離のP E A Aおよび遊離のI g Gが赤血球を溶解する能力と比較した。この結果を、図3に示す。

#### 【0097】

(実施例3 : ストレプトアビジン / P E A A結合体のpH感受性とB - P E A A結合体のpH感受性、およびストレプトアビジン / B - P E A A結合体のpH感受性との比較)

(目的)

タンパク質とのP P A A cの複合体化が、細胞膜を破壊するその能力に影響を及ぼさないことを確認すること。

#### 【0098】

(プロトコル)

P P A A cのビオチン化 : ストレプトアビジン (s t e p t a v i d i n) - ビオチン親和性によるストレプトアビジンとの複合体化 (P P A A c : ストレプトアビジンの化学量比は、3 : 1および1 : 1の両方)。

#### 【0099】

R B Cは、全血を、4分間遠心濾過することによって収集した。所望のpHにおいて、100mM二塩基性リン酸ナトリウムで3回洗浄した。再懸濁し、そして200  $\mu$  lあたり10<sup>8</sup>のR B Cになるように希釈した。各々のチューブは、800  $\mu$  lの緩衝液、200 : 1のR B C懸濁液、およびポリマーサンプルを含んでいた。各々のサンプルを3連で行い、そして再現性を確認するために繰り返した。チューブを、37℃で1時間半インキュベートした。チューブを、微量遠心分離機を用いて、最高速度で5分間回転させた。溶解を、541nmでの上清

の吸光度を測定することによって決定した。この吸光度は、上清中に遊離されたヘモグロビンの量を反映する。溶解パーセントは、水中の赤血球を100%溶解と仮定して計算した。ポリマーを含まない緩衝液中またはストレプトアビジンを添加した緩衝液中のRBCのコントロールもまた、試験した。4つの異なるストレプトアビジンおよびPEAAサンプルが赤血球を溶解する能力を、100mMの二塩基性リン酸ナトリウム中で、およそ $10^8$ の赤血球を使用し、そして37℃で1時間インキュベートするpH5.0での溶血アッセイを実施することによって比較した。4つのサンプルは、ビオチン化したPEAA（「B-PEAA」）、アミン終結PEAA、ストレプトアビジンおよびアミン終結PEAAの物理的混合物、ならびにストレプトアビジンおよびビオチン化したPEAAの複合体であった。この最後のサンプルで形成される複合体は、ビオチン-ストレプトアビジン親和性の結果である。タンパク質およびポリマーを含む両方のサンプルにおいて、PEAA：ストレプトアビジンのモル比は、3：1（図4Aおよび図4C）または1：1（図4Bおよび図4D）であった。この比は、全ての濃度のPEAAについて一定に保持された。

#### 【0100】

この結果は、改変されていないアミン終結PEAAにおいてみられるプラトーと比較して、PEAAの任意の改変（ビオチン化またはタンパク質との結合）が、溶血プロフィールを増大させることを示す。溶血パーセントにおける有意差は、任意の異なるポリマータンパク質複合体間のpH（図4Cおよび図4D）または濃度の関数として全く観察されなかった。溶血のパーセンテージは、pH依存性およびポリマー濃度依存性であった。

#### 【0101】

（実施例4：細胞死は、PEAAをトキシンと混合する場合に増強される）

図5は、pH感受性ポリマー誘導性の膜破壊を使用する、イムノトキシン治療の模式図である。工程1は、レセプター媒介性エンドサイトーシスである；工程2は、ポリマー-イムノトキシンがエンドソーム中に吸収される場合である；工程3は、エンドソームのpHが5～6であることが膜溶解を誘発する場合である；そして工程4は、イムノトキシンが細胞質中に放出される場合であり、細胞死



となる。

#### 【0102】

##### (目的)

P P A A c と リ シ ン A 鎖 (R T A) と を 混 合 す る こ と が 、 そ の エ ン ド ソ ー ム の 放 出 お よ び 毒 性 を 増 強 す る か 否 か を 決 定 す る こ と 。 P P A A c お よ び R T A で 処 理 さ れ た 細 胞 に お い て 、 タ ン パ ク 質 合 成 の 阻 害 を 定 量 す る た め の エ ン ド サ イ ト ー シ ス ア ッ セ イ を 、 P P A A c の み で 処 理 さ れ た 細 胞 、 R T A の み で 処 理 さ れ た 細 胞 、 ま た は 処 理 さ れ て い な い 細 胞 と 比 較 し た 。

#### 【0103】

##### (プロトコル)

R a m o s 細 胞 を 、 1 0 0  $\mu$  l 中 で 1 ウ ェ ル あ た り 5 0 , 0 0 0 の 濃 度 で 、 ロ イ シ ン 非 含 有 培 地 中 に 懸 濁 し た 。 こ の 細 胞 を 、 3 7  $^{\circ}$ C で 4 時 間 培 養 し 、 次 い で 放 射 性 標 識 化 し た ロ イ シ ン ( 2 5  $\mu$  l の 培 地 あ た り 1  $\mu$  C i の <sup>3</sup>H - ロ イ シ ン ) を 添 加 し 、 そ し て こ の 細 胞 を 、 3 7  $^{\circ}$ C で さ ら に 4 時 間 培 養 し た 。 2 5  $\mu$  l の サ ン プ ル を 、 各 々 の サ ン プ ル を 3 連 で 、 各 々 の ウ ェ ル に 移 し た 。 コ ン ト ロ ー ル ウ ェ ル は 、 2 5  $\mu$  l の 培 地 を 含 ん で い た 。 こ の ウ ェ ル を 、 濾 紙 上 に 収 集 し 、 そ し て 放 射 能 の 量 を 、 シ ン チ レ ー シ ョ ン カ ウ ン タ ー を 使 用 し て カ ウ ン ト し た 。 ポ リ マ ー ト キ シ ン を 、 P P A A c : R T A = 3 : 1 の 比 で 、 処 理 さ れ た 細 胞 に 添 加 し た 。

#### 【0104】

##### (結果)

図 6 に 示 さ れ る よ う に 、 細 胞 死 は 、 R T A が 細 胞 培 養 物 中 に 単 独 で 添 加 さ れ た 場 合 、 全 く 観 察 さ れ な か っ た 。 こ れ は お そ ら く 、 ト キ シ ン の リ ソ ソ ー ム へ の 細 胞 内 輸 送 に 起 因 す る 。 P P A A が R T A と 物 理 的 に 混 合 さ れ た 場 合 、 混 合 物 の 漸 増 濃 度 ( 3 : 1 の P P A A : R T A 固 定 比 で ) は 、 細 胞 死 の 数 を 増 加 さ せ た 。 ポ リ マ ー 単 独 で は 、 細 胞 に 対 し て 毒 性 で な か っ た 。 こ れ ら の 結 果 は 、 P P A A c お よ び R T A の 混 合 物 が 、 R T A 単 独 が 非 毒 性 で あ る 濃 度 に お い て 、 濃 度 依 存 様 式 の タ ン パ ク 質 合 成 阻 害 を 生 じ る こ と を 示 す 。 こ れ ら の 観 察 は 、 こ の ポ リ マ ー が ト キ シ ン の 作 用 を 増 強 す る た め に 細 胞 内 で 作 用 す る こ と を 示 す 。 こ れ は お そ ら く 、 エ ン ド ソ ー ム 膜 を 破 壊 こ と に 起 因 す る 。

## 【0105】

(実施例6：PEAAの溶血活性は、Tone-Burst超音波と組み合わせられる場合に増強される)

過去10年において、疾患および癌についてインビボにおける局在化された薬物処置および遺伝子治療は、研究の主要な領域になってきた。この技術について主要な障害の1つは、いったん薬物が体内の所望の位置に送達されると、細胞内部に薬物を獲得することである。細胞は、その細胞内環境への侵入を試みる異物および生物に対して効果的な防御を有する。ソノポレーション (Sonoporation) は、この課題に対する可能な解決策と考えられる。エレクトロポレーションおよび他の技術は、細胞膜の浸透性を増大するために過去に使用されてきたが、これらは、インビトロでの研究に限定される。集束超音波を使用して、細胞膜を、エレクトロポレーションと類似の様式において、インビボで高分子に対して浸透性にし得る。このことは、薬物が、残りの組織を曝すことなく標的化細胞に入ることを可能にする。モデル系としてヒト赤血球を使用する、超音波および合成ポリマー溶解試薬であるポリ(2-エチルアクリル酸) (PEAA) の経時的な細胞膜破壊能力を調べた。PEAAは、弱酸性条件において原形質膜において細孔およびチャネルを作製する能力を有する (Chungら、1996)。しかし、この効果は、細胞膜と相互作用するポリマーの数に正比例する。この本研究は、有効濃度未満のPEAAの溶血効果に対する超音波の影響を、インキュベーション時間の関数 (実験A)、pHならびにPEAAおよび超音波による赤血球の曝露の順番の関数 (実験B) として試験する。

## 【0106】

(方法)

(血液サンプル)

新鮮なヒト血液を、各々の実験について得た。細胞を、150mM NaCl溶液で3回洗浄した。次いで、この細胞を、リン酸緩衝化生理食塩水溶液で希釈し、 $2 \times 10^8$  細胞/mlの最終濃度を得た。この溶液のpHは、実験の選択に基づいて、6.1 (これはPEAAの活性のために必要である) または7.4 (これは、PEAAを不活化する) である。いずれの場合においても、総量1m

1の細胞懸濁液を、ポリスター熱収縮チューブ (Advanced Polymers, Inc., Salem NH) から構築されたサンプルチューブ中にペットで入れ、そして出力トランスデューサーの焦点に置いた。

#### 【0107】

##### (音波の設定)

全ての超音波処理を、脱気したリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を含む、 $6.5\text{ cm} \times 12.5\text{ cm} \times 12.5\text{ cm}$  のアクリルタンク中で実施した。このタンク内の温度を、加熱システムを使用して、 $37^\circ\text{C}$  に維持した。このタンクを、常にトランスデューサーの焦点にサンプルチューブを保持するように設計した。15 mm の焦点幅およびおよそ12 mm の焦点長を有する、直径70 mm の出力集束トランスデューサー (focused power transducer) (Sonic Concepts, Woodinville, WA) を、タンクの壁の1つに取り付けた。放射力の平衡を使用して、出力トランスデューサーを校正した。単一エレメント1.1 MHz トランスデューサーは、 $2200\text{ W}/\text{cm}^2$  の SATA 強度で10 ms のトーンバースト (PRF = 1 Hz) を伝送する。シリコン吸収装置を、反射を減少させるために、タンクの反対側に置く。受動的なキャビテーション検出技術 (Atchleyら、1988) を使用して、気泡形成について音波シグナルをモニタリングする。5 MHz の集束ハイドロホンを、集束トランスデューサーのビーム行路に対して90度に配置する。このハイドロホンを、出力トランスデューサーと共焦点になるように、タンクの壁に取付ける。ハイドロホンによって受信された全ての音波シグナルは、LeCroy 9304 AM オシロスコープ上に示される (超音波をポリマーの存在下で適用した場合、キャビテーション事象における増加が溶血レベルの増加とよく相関することが研究の全てにおいて判明した)。このタンクを清掃し、そして $37^\circ\text{C}$  の脱気されたリン酸緩衝化生理食塩水 (pH = 7.4) を満たし、そしてサンプルチューブを、出力トランスデューサーの焦点に置く。

#### 【0108】

希釈された赤血球の各々のサンプルを、 $2200\text{ W}/\text{cm}^2$  の強度で、1%の衝撃係数で150, 10 ms パルスの1.1 MHz 超音波波形に曝露した。低い

細胞数が、キャビテーションのしきい値を減少させ、細胞／気泡相互作用の可能性を増強し、そして低い衝撃係数が、熱効果を減少させた。

#### 【0109】

##### (目的A)

PEAA単独の活性は、溶液のpHおよびインキュベーション時間に依存する。このポリマーは、pH 6.1でその立体配座を活性状態へと変化させ、そして最大の細胞溶解を達成するために、37℃で1時間、細胞懸濁液とともにインキュベートされる。10  $\mu$ gのPEAAを、1mlの細胞懸濁液に添加し、そして超音波曝露の前にインキュベートした。超音波／ポリマー相乗効果について試験するために、サンプルを、PEAA注入後、 $t=0$ 、20、40または60分に処理した。超音波処理後、直ちに、1つの群の細胞を、14,000rpmで2分間、微量遠心分離機(Eppendorf 5410、Westbury、NY)で回転させた。次いで、この上清を取り出し、そしてヘモグロビン含有量を、分光光度計(spectrophotometer)を用いて、541nmにおいて測定する。他の群の細胞を水浴中に戻し、残りの時間インキュベートし、その後、これらの細胞懸濁液を、遠心沈澱などを上記のように行った。両方の場合において、結果を、蒸留された脱イオン水とともに血液サンプルとを混合することによって達成される100%の溶血に対して、標準化する。

#### 【0110】

##### (結果A)

ヒト赤血球に対する超音波およびPEAA単独の効果についての予備試験において、150トーンバーストについては、3000W/cm<sup>2</sup>未満に、または50  $\mu$ g未満のPEAAに細胞を曝露することは、有意でない溶血レベルを生じることが決定された。図7Aは、このポリマーが超音波処理前に少なくとも20分間、赤血球とともにインキュベートされ得、そして浴に戻されるかまたは直ちに遠心されるかいずれかの場合の、最適な溶血レベルを示す。この第1のセットの実験において、溶血性パーセントにほとんど差異が見られなかった(図7A)。

#### 【0111】

##### (目的B)

この実験の目的は、pH、ならびに1時間のPEAAおよび超音波に対する赤血球の曝露の順番の効果を試験することであった。この実験について、細胞懸濁液のpHは、6.1または7.4のいずれかであった。pH=6.1の場合、1つの実験において、超音波を、PEAAの導入前に適用した。別の実験において、超音波を、PEAAの導入後に適用した。pH=7.4の場合、超音波を、PEAAの導入後に適用した。

#### 【0112】

##### (結果B)

細胞懸濁液のpHおよび超音波処理の間のPEAAの存在は、PEAAの効果の増強を生じるために明らかに重要であった。ポリマー構造体の立体配座は、PEAAが溶解している溶媒のpHに依存する。pH=7.4での細胞の処理または懸濁液をPEAAと混合する前の超音波の適用、およびpH=6.1で1時間のインキュベーションは、ほとんど溶血を産生せず(図7B)、一方pH6.1において、PEAAの存在下で赤血球に適用された超音波は、十分なレベルの溶血を生じた。したがって、超音波処理の間のPEAAの存在は、この実施例における解答である。

#### 【0113】

本明細書中で引用された参考文献の教示は、本明細書中で特に援用される。本発明の改良および改変は、前述の詳細な説明から当業者に明確であり、そして前述の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1A】

図1Aは、ポリ(エチルアクリル酸)(PEAA)が赤血球を溶解する能力をpHの関数として示すグラフである。溶血パーセントは、500 $\mu$ gのPEAAおよびコントロールについて5.1および7.4の溶液pHで示される。

##### 【図1B】

図1Bは、ポリ(プロピルアクリル酸)(PPAA)が赤血球を溶解する能力をpHの関数として示すグラフである。溶血パーセントは、3 $\mu$ gのPPAAおよびコントロールについて6.1および7.4の溶液pHで示される。

## 【図1C】

図1Cは、PPAAおよびPEAAが赤血球を溶解する能力をpHの関数として比較したグラフである。溶血パーセントは、PPAAおよびPEAAについて6.1の溶液pHで示される。

## 【図1D】

図1Dは、ポリ（ブチルアクリル酸）（PBAA）およびPPAAが赤血球を溶解する能力をpHの関数として比較したグラフである。溶血パーセントは、PBAAについて6.1および7.4の溶液pH、ならびにPPAAについて6.1の溶液pHで示される。

## 【図1E】

図1Eはアクリル酸エチルとアクリル酸（EAA）のランダムコポリマー、ならびにアクリル酸エチルとPEAAのランダムコポリマーが赤血球を溶解する能力をpHの関数として比較したグラフである。赤血球溶血パーセントは、5.5の溶液pHで示される。

## 【図1F】

図1Fは、pH5.5でのAAc/PA：50% AAc/50% PA、40% AAc/60% PA；および60% AAc/40% PAのコポリマーの溶解パーセントを示す。

## 【図1G】

図1Gは、pH5.5でのAAc/BA：50% AAc/50% BA；75% AAc/25% BA；および90% AAc/10% BAのコポリマーの溶解性パーセントを示す。

## 【図2】

図2は、EALA（GALA）およびEALA/ポリアクリル酸結合体（GALA/PA）の赤血球を溶解する能力を比較するグラフである。濃度に対する赤血球溶血パーセントを、EALAおよびEALA/ポリアクリル酸結合体の両方について示す。

## 【図3】

図3は、PEAA、IgG/PEAA結合体、およびIgG単独についての赤

血球を溶解する能力を比較するグラフである。濃度に対する赤血球溶血パーセントを、P E A A、I g G / P E A A 結合体、および I g G 単独について示す。

【図 4 A】

図 4 A～Dは、P E A A、ストレプトアビジン / P E A A 結合体、ビオチニル化 P E A A およびストレプトアビジン / ビオチン P E A A 結合体 (3 : 1 または 1 : 1 のいずれかの比で) の赤血球を溶解する能力を比較するグラフである。ポリマー濃度に対する赤血球溶血パーセントを、P E A A、ストレプトアビジン / P E A A 結合体、ビオチニル化 P E A A およびストレプトアビジン / ビオチン P E A A 結合体について、図 4 A および 4 B に示す；赤血球溶血パーセントを p H の関数として図 4 C および 4 D に示す。

【図 4 B】

図 4 A～Dは、P E A A、ストレプトアビジン / P E A A 結合体、ビオチニル化 P E A A およびストレプトアビジン / ビオチン P E A A 結合体 (3 : 1 または 1 : 1 のいずれかの比で) の赤血球を溶解する能力を比較するグラフである。ポリマー濃度に対する赤血球溶血パーセントを、P E A A、ストレプトアビジン / P E A A 結合体、ビオチニル化 P E A A およびストレプトアビジン / ビオチン P E A A 結合体について、図 4 A および 4 B に示す；赤血球溶血パーセントを p H の関数として図 4 C および 4 D に示す。

【図 4 C】

図 4 A～Dは、P E A A、ストレプトアビジン / P E A A 結合体、ビオチニル化 P E A A およびストレプトアビジン / ビオチン P E A A 結合体 (3 : 1 または 1 : 1 のいずれかの比で) の赤血球を溶解する能力を比較するグラフである。ポリマー濃度に対する赤血球溶血パーセントを、P E A A、ストレプトアビジン / P E A A 結合体、ビオチニル化 P E A A およびストレプトアビジン / ビオチン P E A A 結合体について、図 4 A および 4 B に示す；赤血球溶血パーセントを p H の関数として図 4 C および 4 D に示す。

【図 4 D】

図 4 A～Dは、P E A A、ストレプトアビジン / P E A A 結合体、ビオチニル化 P E A A およびストレプトアビジン / ビオチン P E A A 結合体 (3 : 1 または

1 : 1 のいずれかの比で) の赤血球を溶解する能力を比較するグラフである。ポリマー濃度に対する赤血球溶血パーセントを、PEAA、ストレプトアビジン／PEAA結合体、ビオチニル化PEAAおよびストレプトアビジン／ビオチンPEAA結合体について、図4Aおよび4Bに示す；赤血球溶血パーセントをpHの関数として図4Cおよび4Dに示す。

【図5】

図5は、pH感受性ポリマー誘導性膜破壊を用いる免疫毒性治療の略図である。

【図6】

図6は、RTA、PPAAcおよびRTA+PPAAcについてのポリマーの濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の関数として、パーセント正規化されたタンパク質合成として測定された、PPAAcと混合することによるRTA毒性の増強のグラフである。

【図7A】

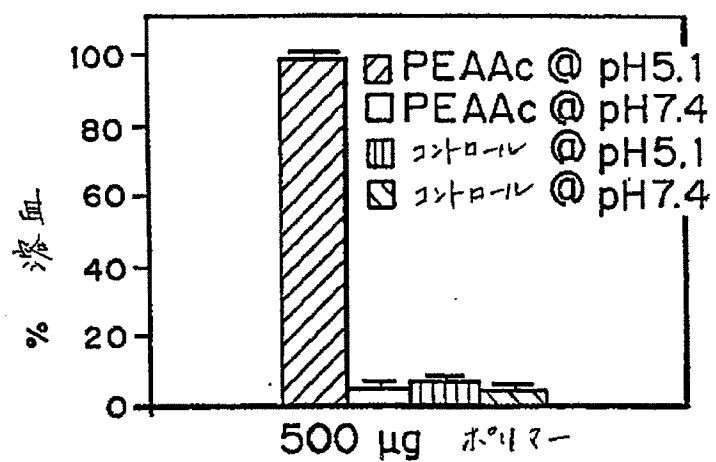
図7Aは、赤血球の溶解におけるPEAAおよび超音波の組み合わせの効果のグラフである（分時間にわたる溶血パーセント）。

【図7B】

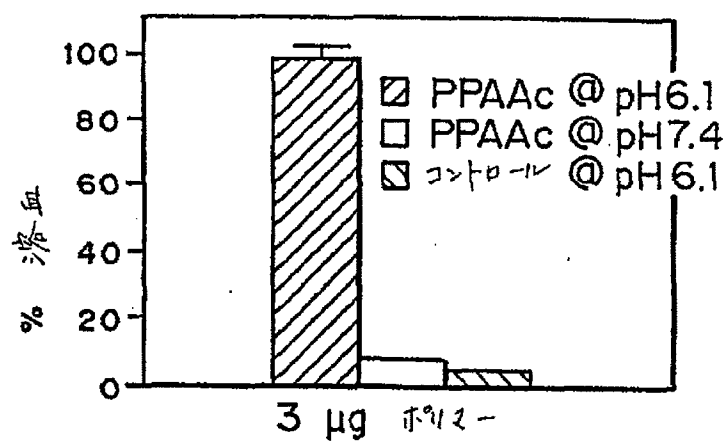
図7Bは、PEAA、超音波、PEAA後のpH6.1での超音波、超音波後のpH6.1でのPEAA、およびPEAA後のpH7.4での超音波についての溶血パーセントのグラフである。



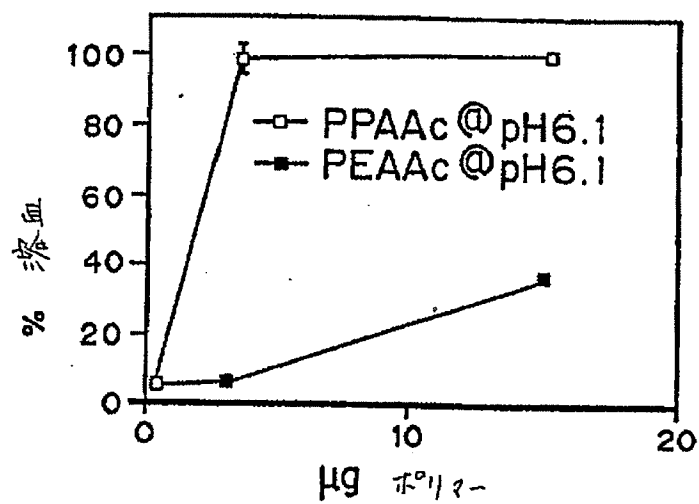
【図1 A】



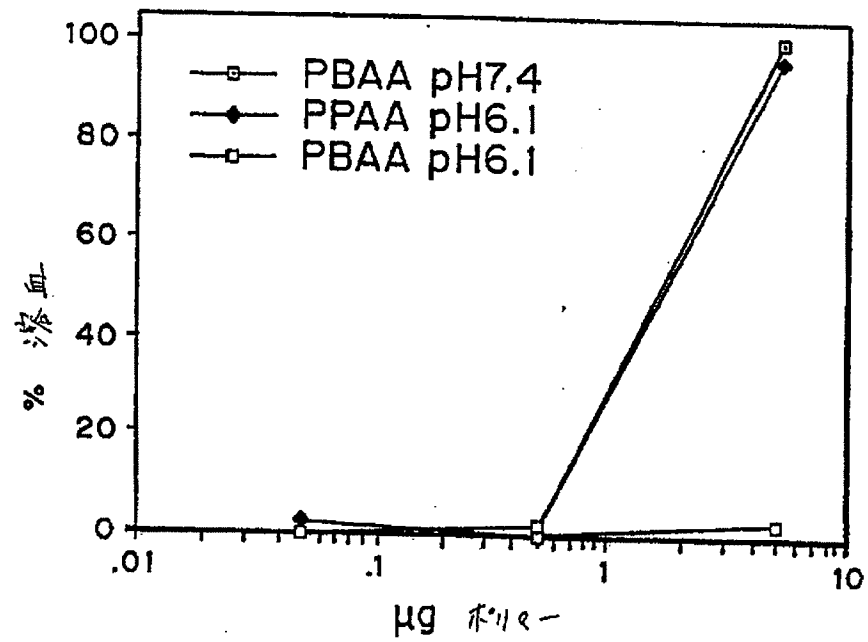
【図1 B】



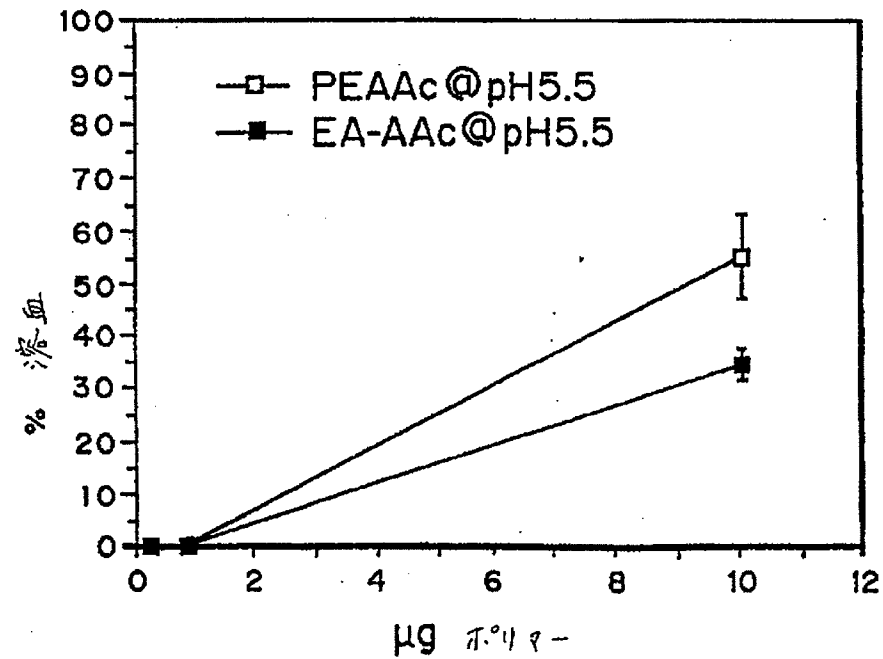
【図1 C】



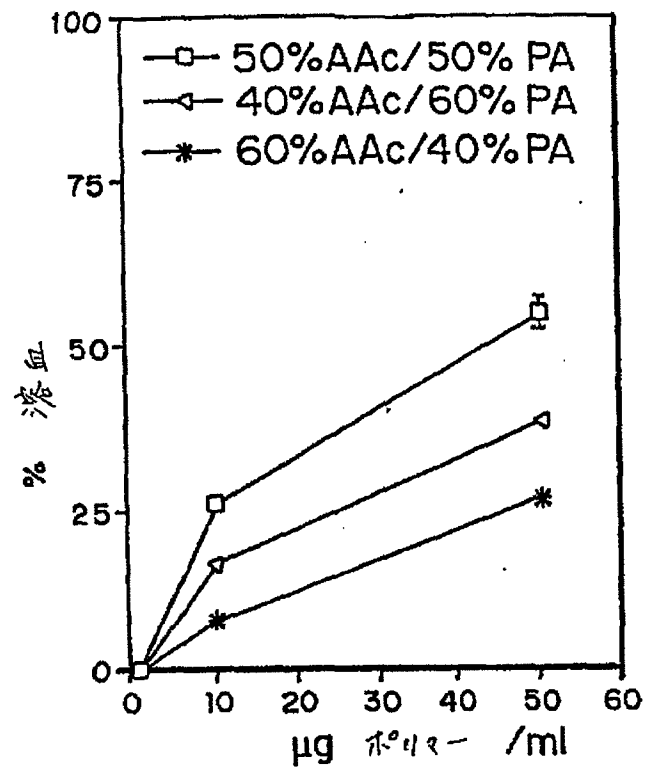
【図1D】



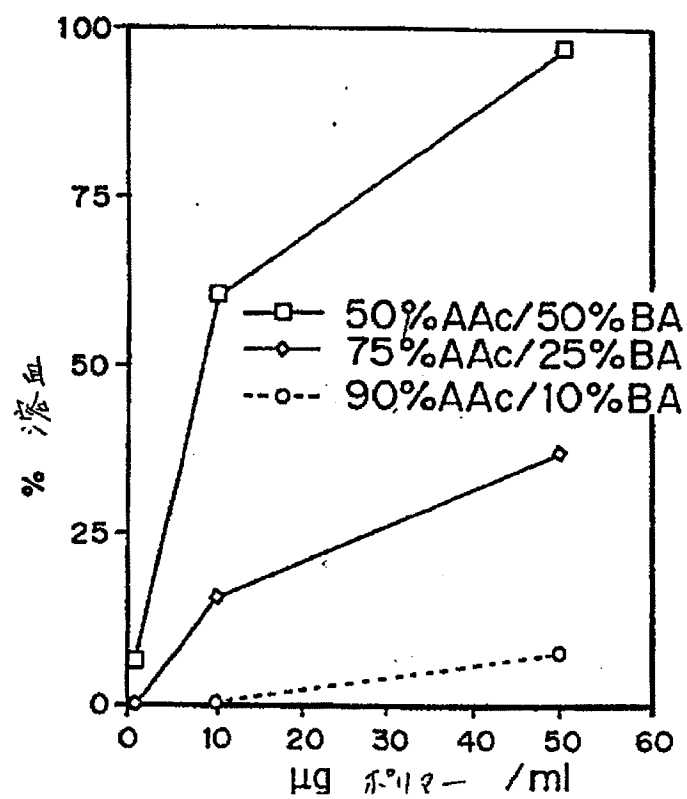
【図1E】



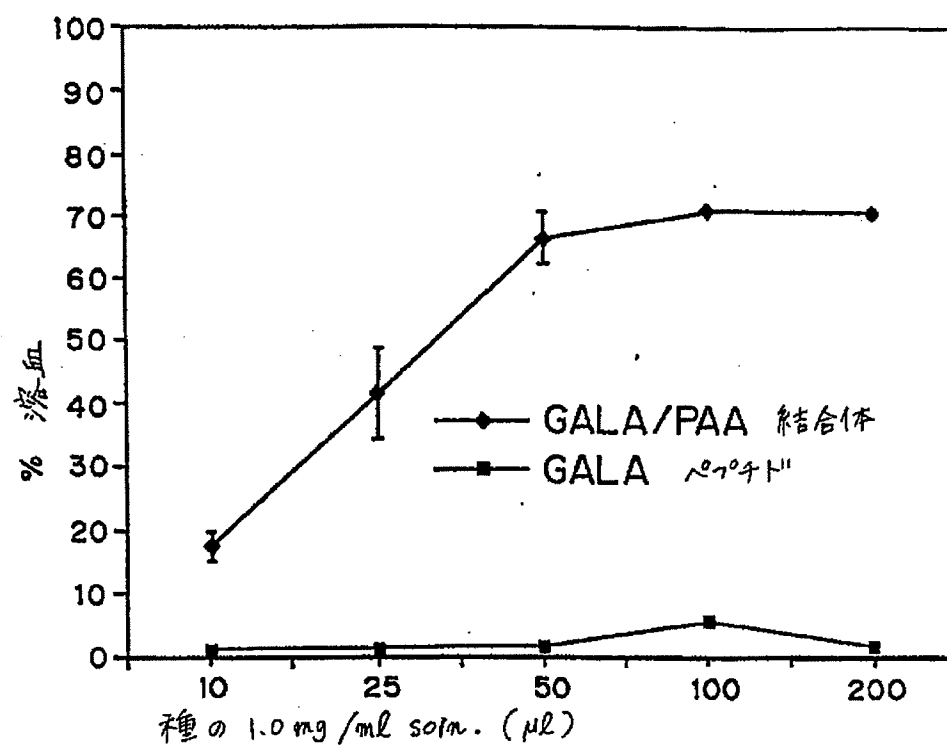
【図1 F】



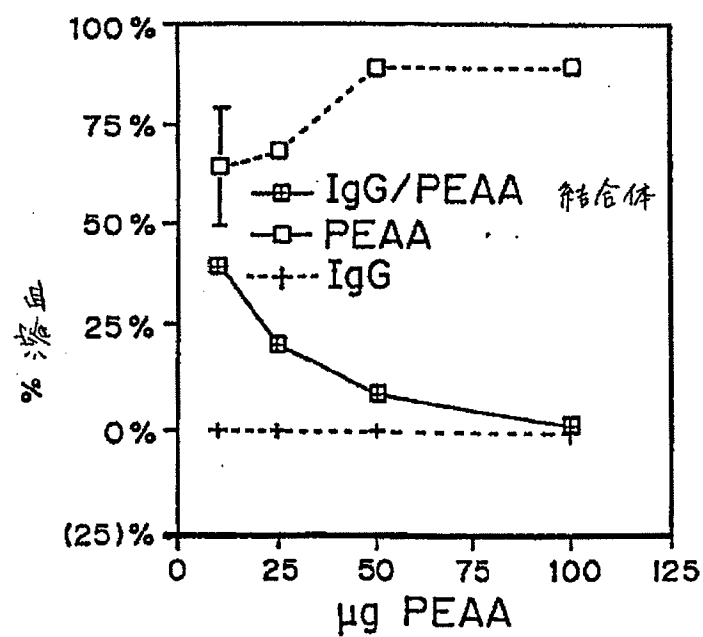
【図1 G】



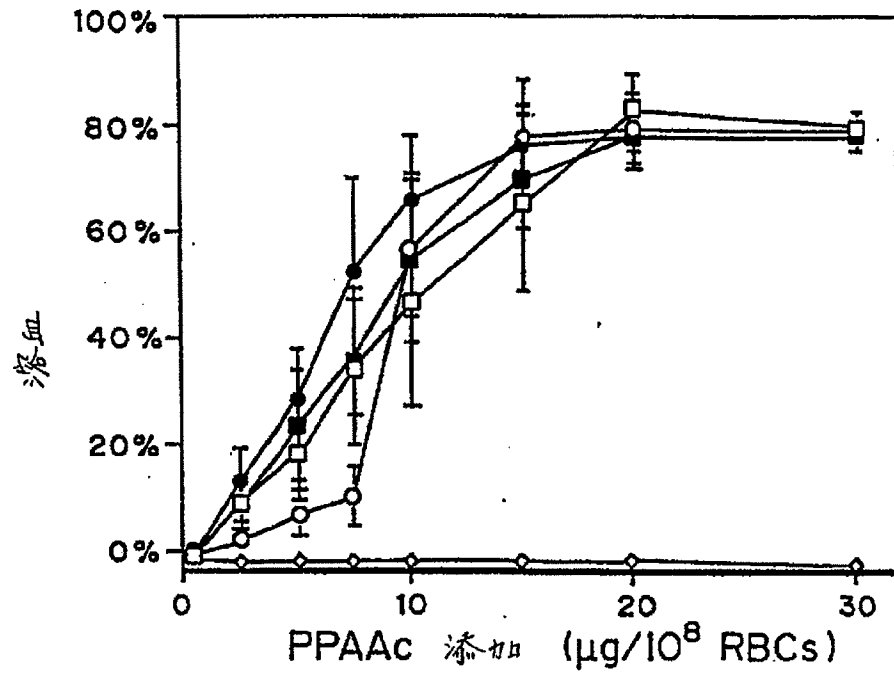
【図2】



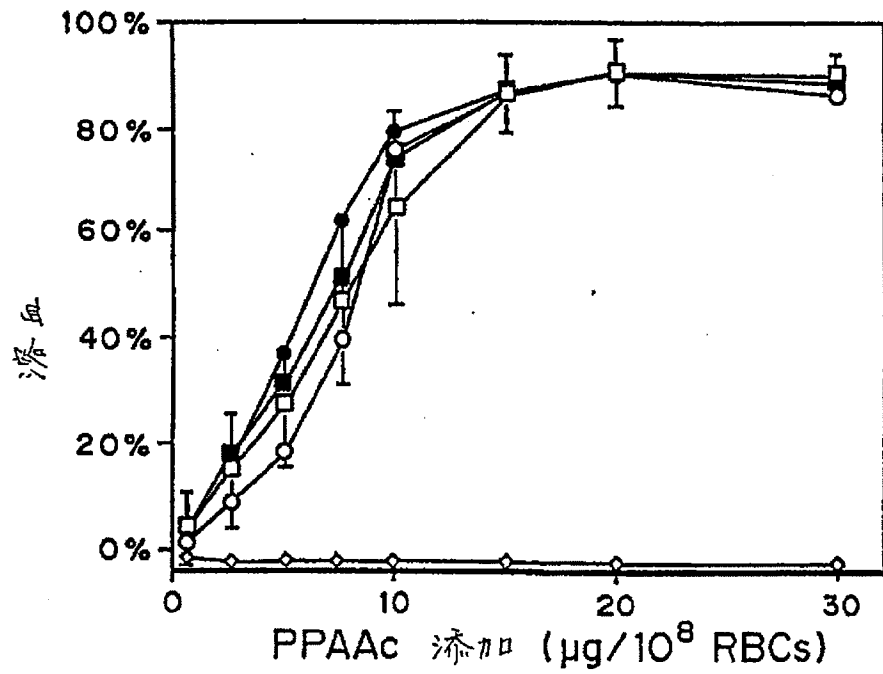
【図3】



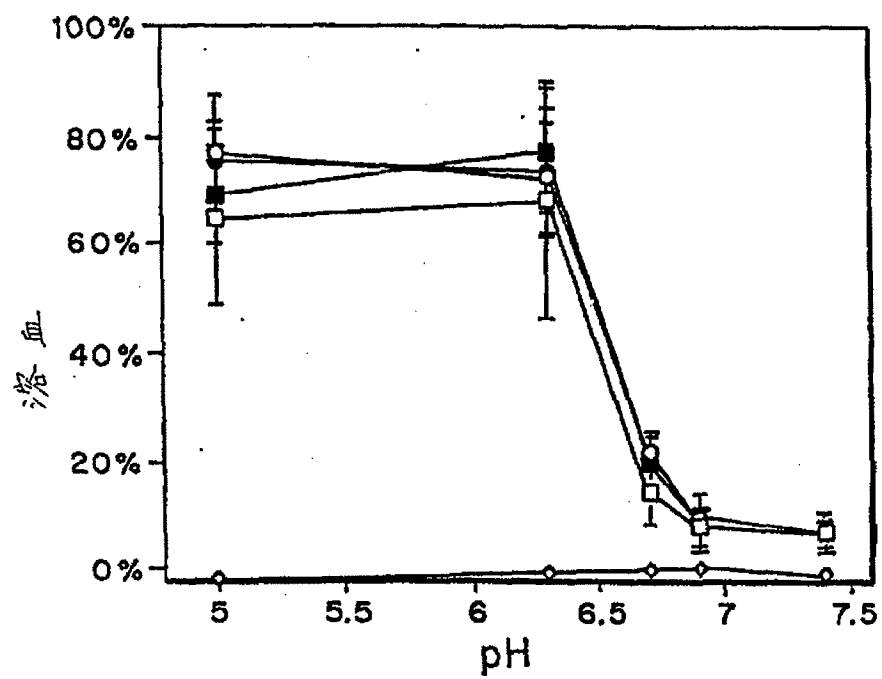
【図4A】



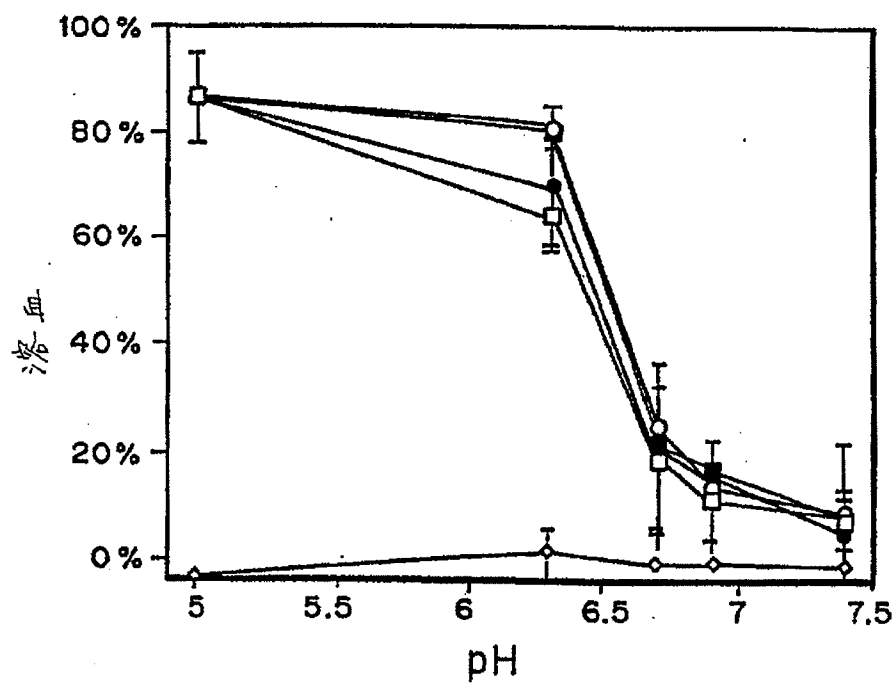
【図4B】



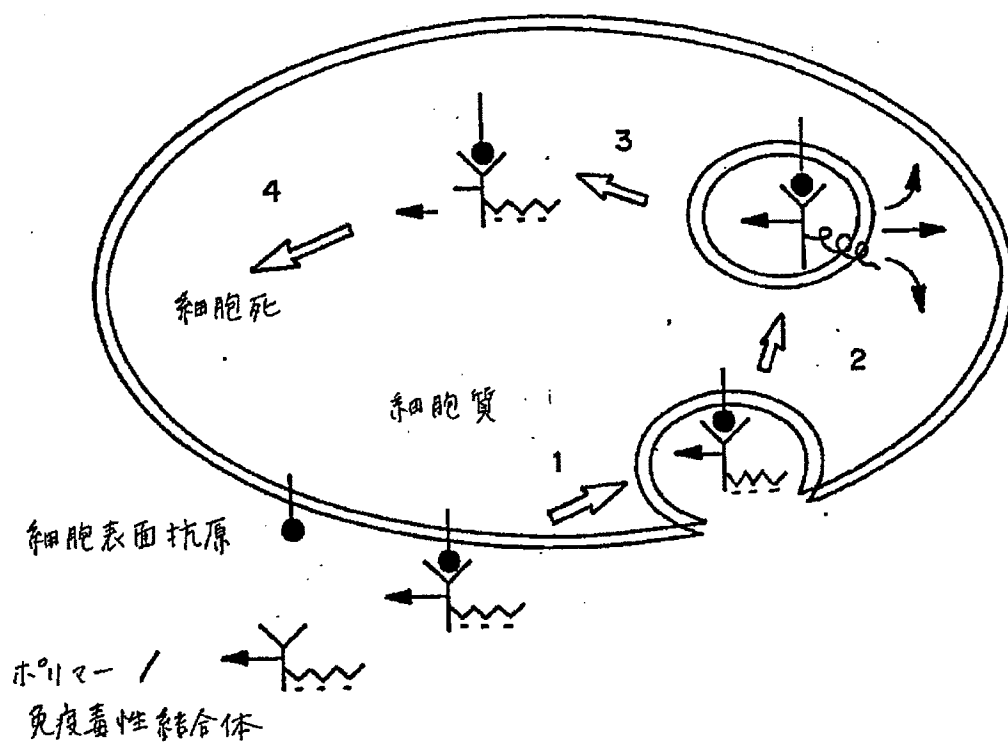
【図4C】



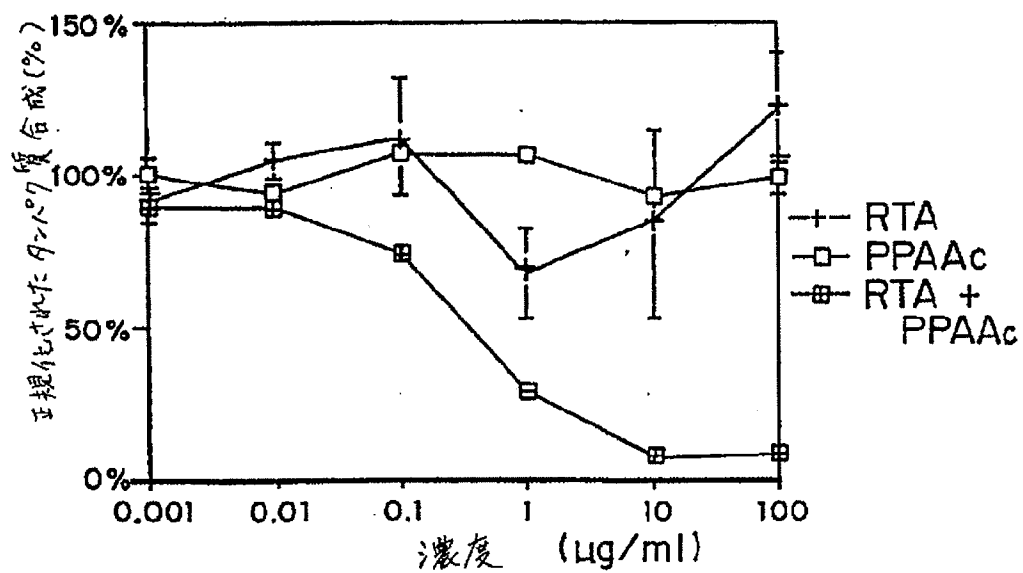
【図4D】



【図5】

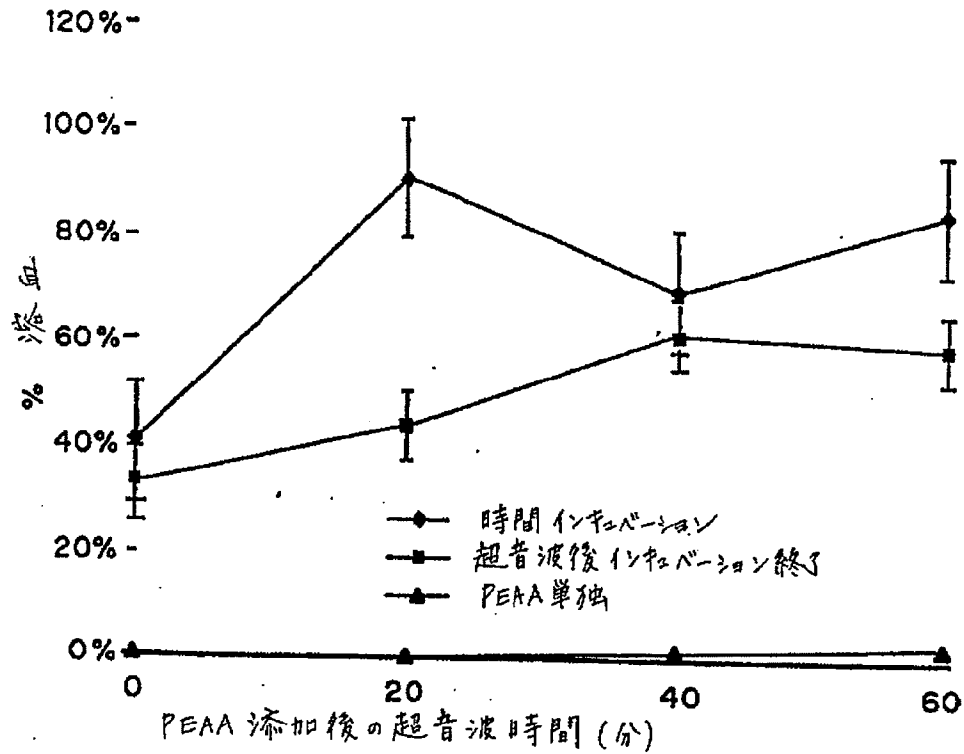


【図6】

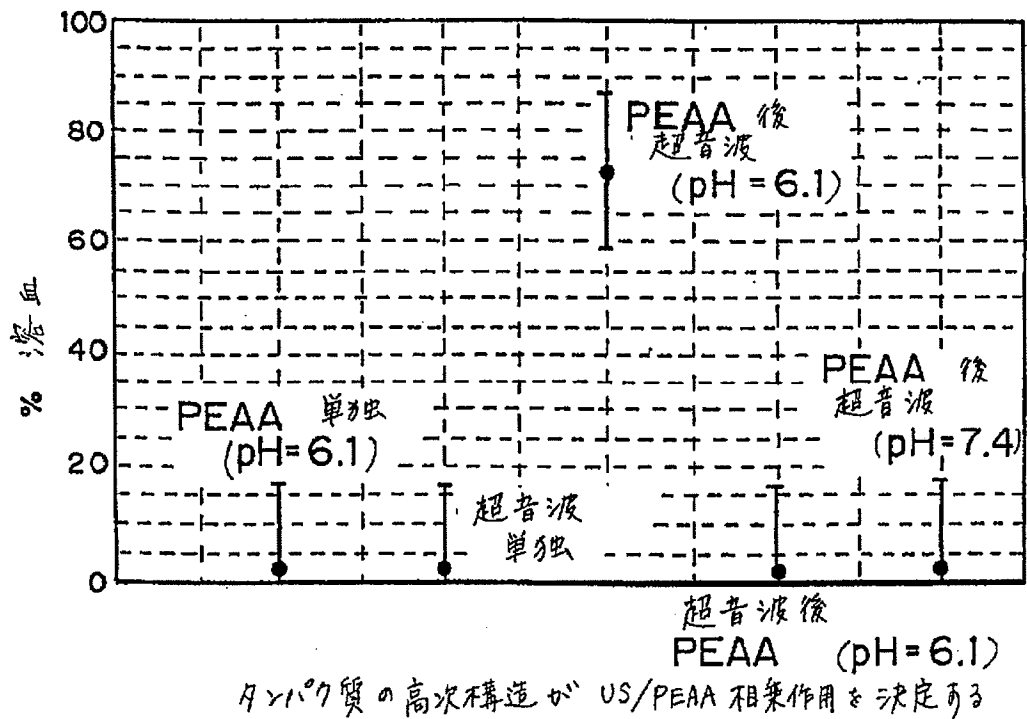




【図7A】



【図7B】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 99/00122		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 A61K47/32 A61K47/42 A61K47/48 A61K41/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 09068 A (UNIV WASHINGTON) 13 March 1997 see page 4, line 11-20 see page 10, line 19 - page 22, line 14 see page 53, line 15 - page 54, line 4 see claims see figure 8	1-8,12 15
X	WO 96 40958 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 19 December 1996 see page 7, line 7-24 see page 8, line 25-34 see page 9, line 34 - page 10, line 15 see page 13, line 5-13 see page 15, line 10-15 see page 19, line 21 - page 20, line 7 see page 66, line 18-22 see claims	1,3,5,6, 8,11,12 15-20
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 April 1999		Date of mailing of the international search report 28/04/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer La Gaetana, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 99/00122

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 547 932 A (CUIEL DAVID T ET AL) 20 August 1996	1,3,5,6, 8,9,11, 12 15-20
A	see column 4, line 63 - column 5, line 29 see column 9, line 51-62 see column 15, line 36-51 see claims see example 12	
X	PLANK C ET AL: "THE INFLUENCE OF ENDOSOME-DISRUPTIVE PEPTIDES ON GENE TRANSFER USING SYNTHETIC VIRUS-LIKE GENE TRANSFER SYSTEMS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 17, 29 April 1994, pages 12918-12924, XP000615488 cited in the application see abstract see page 12918, column 1 see Discussion	1,3,5,6, 11
A	WO 97 04832 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 13 February 1997 see page 6, line 1 - page 7, line 2 see page 11, line 10 - page 12, line 7 see page 12, line 34 - page 13, line 7 see page 23, line 21 - page 24, line 5 see claims 1,2,13,22-24	1-20
A	US 4 657 543 A (LANGER ROBERT S ET AL) 14 April 1987 see column 1, line 45-64 see column 4, line 41-61 see claims	1-20
X	HUGHES JA, ARONSHN AI, AVRUTSKAYA AV, JULIANO RL: "Evaluation of adjuvants that enhance the effectiveness of antisense oligodeoxynucleotides" PHARMACOLOGICAL RESEARCH, vol. 13, no. 3, March 1996, pages 404-10, XP002100198 cited in the application see abstract see Discussion	1,3,5,6, 12,13
A	KOST J, LANGER R: "Responsive polymer systems for controlled delivery of therapeutics" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 10, no. 4, April 1992, pages 127-131, XP002100199 see the whole document	1-20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 99/00122

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
See FURTHER INFORMATION SHEET PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 99/00122

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9709068 A	13-03-1997	AU 7011096 A	27-03-1997
		CA 2230557 A	13-03-1997
		EP 0851768 A	08-07-1998
WO 9640958 A	19-12-1996	AU 5714296 A	30-12-1996
		CA 2222550 A	19-12-1996
		EP 0832269 A	01-04-1998
US 5547932 A	20-08-1996	AU 671084 B	15-08-1996
		AU 2652692 A	03-05-1993
		BG 98718 A	28-02-1995
		BR 9206559 A	08-11-1994
		CA 2118816 A	31-03-1993
		CZ 9400746 A	17-05-1995
		WO 9307283 A	15-04-1993
		EP 0545016 A	09-06-1993
		EP 0607206 A	27-07-1994
		FI 941474 A	30-03-1994
		HU 71312 A	28-11-1995
		HU 9500694 A	29-01-1996
		JP 10506001 T	16-06-1998
		MX 9205543 A	01-05-1993
		NO 941154 A	29-03-1994
		NZ 244306 A	26-07-1995
		SG 44680 A	19-12-1997
		SK 36894 A	10-08-1994
WO 9704832 A	13-02-1997	CN 1070946 A	14-04-1993
		ZA 9207460 A	21-02-1994
		US 5814599 A	29-09-1998
		AU 6598796 A	26-02-1997
		CA 2200984 A	13-02-1997
US 4657543 A	14-04-1987	EP 0781150 A	02-07-1997
		JP 10509632 T	22-09-1998
US 4657543 A	14-04-1987	CA 1291064 A	22-10-1991
		US 4779806 A	25-10-1988

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	FI	ターム(参考)
A 6 1 K 47/48		A 6 1 K 47/48	
(72)発明者	ステイトン, パトリック アメリカ合衆国 ワシントン 98117, シアトル, エヌ. ダブリュー., 25テ ィーエイチ アベニュー 8344		
(72)発明者	プレス, オリバー アメリカ合衆国 ワシントン 98125, シアトル, エグゼター アベニュー エ ヌ. イー. 11018		
(72)発明者	ティレル, デイビッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 91106, パサデナ, アーデン ロード 714		
(72)発明者	マーシー, ニレン アメリカ合衆国 ワシントン 98105, シアトル, ブルックリン アベニュー 3801, アpartment エル4100		
(72)発明者	ラッキー, チャンタル アメリカ合衆国 ワシントン 98115, シアトル, エヌ. イー., 23アールデ ィー アベニュー 8809, アpartment ト 3		
(72)発明者	クラム, ローレンス エイ. アメリカ合衆国 ワシントン 98027, イサクワ, 175ティーエイチ アベニュー エス. イー. 4662		
(72)発明者	モーラド, ピエール ディー. アメリカ合衆国 ワシントン 98107, シアトル, エヌ. ダブリュー. 49ティ ーエイチ ストリート 109		
(72)発明者	ポーター, タイロン エム. アメリカ合衆国 ワシントン 98105, シアトル, 17ティーエイチ アベニュー エヌ. イー. 4733, アpartment 26		
Fターム(参考)	4C076 AA06 AA17 AA19 AA24 BB13 BB31 CC27 EE09 EE10 EE41 FF02 FF34 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA05 MA23 NA11 ZB26		